



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **Influência do Molibdénio na acumulação de nitratos nas folhas de alface (*Lactuca sativa* L.)**

**Bruno Miguel Pedroso Neves**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientador: Professor Doutor Ernesto José de Melo Pestana de Vasconcelos

Co-orientadora: Professora Doutora Fernanda Maria Miranda Cabral

### **Júri:**

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Ernesto José de Melo Pestana de Vasconcelos, Professor Catedrático do do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;  
Doutora Fernanda Maria Miranda Cabral, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;  
Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;  
Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar queria agradecer ao meu pai, Carlos Neves, e à minha mãe, Lina Neves, por me permitirem mais esta experiência, por me apoiarem e me facultarem “todos” os recursos necessários à realização dos ensaios. Também quero manifestar os meus agradecimentos à minha namorada, à minha irmã e ao seu namorado, pela disponibilidade demonstrada em me apoiarem a todos os níveis, especialmente a nível emocional.

Em segundo lugar agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor Ernesto José de Melo Pestana de Vasconcelos e Professora Doutora Fernanda Maria Miranda Cabral, pela dedicação, interesse que demonstraram e pelo constante apoio fornecido, imprescindível para a realização deste estudo.

Agradeço também ao Professor Doutor Fernando Manuel Girão Monteiro pelo auxílio prestado na identificação dos solos utilizados nos ensaios de campo e no ensaio em vasos, à Professora Doutora Maria Odete Pereira Torres por me ter possibilitado o estudo da actividade da enzima nitrato-redutase e também pelo apoio prestado na colheita de amostras para o mesmo e à Doutora Mariana Silva Gomes Mota pela ajuda prestada no estudo da actividade da enzima nitrato-redutase e na discussão dos resultados obtidos.

A todos os funcionários dos diversos departamentos do Instituto Superior de Agronomia pelo espírito de prontidão que sempre demonstraram.

Por fim, agradeço aos meus amigos que, estando presentes em diversas fases da elaboração deste estudo, permitiram momentos de partilha essenciais para um equilíbrio emocional.

## RESUMO

Neste estudo foram desenvolvidos quatro ensaios de campo e um ensaio de vasos, com o objectivo de estudar a diminuição dos nitratos acumulados nas folhas de alface. Para atingir esse objectivo, abordou-se: os efeitos do molibdénio, fornecido à alface pela água de rega e/ou adubação foliar; a influência das variedades/linhas de alface; a supressão da adubação azotada; e a evolução das características dos solos.

Os resultados obtidos permitiram retirar as seguintes conclusões relativas aos efeitos do molibdénio: reduz os nitratos acumulados nas folhas de alface não se observando diferenças significativas entre métodos de aplicação; aumenta a produtividade da cultura, especialmente quando é aplicado por adubação foliar e promove a absorção de azoto nítrico. Concluiu-se que a supressão da adubação azotada reduz os nitratos acumulados nas folhas de alface. Foi ainda possível concluir que, nas mesmas condições edafo-climáticas e culturais, as alfaces de diferentes linhas e/ou variedades acumulam diferentes teores de nitratos, sendo a linha 'Emocion Rz' (var. *capitata*) a que acumulou menos nitratos e a linha 'Ribai Rz' (var. *acephala*) a que acumulou mais.

**Palavras-chave:** Acumulação de Nitratos; redução de Nitratos; Molibdénio; Enzima Nitrato-Redutase; Assimilação de Nitratos; Alface.

## ABSTRACT

In this study four field experiments and one pot experiment were conducted with the aim of studying the decrease of nitrate accumulation in the lettuce leaves. To achieve this objective the following issues were addressed: effects of molybdenum applied either in fertirrigation and/or foliar fertilization; the influence of different lettuce varieties and lines; the suppression of nitrogen fertilization; and the evolution of the soils characteristics.

Results obtained allowed to draw the following conclusions on the effects of molybdenum: promotes the reduction of nitrate accumulation in the lettuce leaves although no significant differences were observed between fertilization methods; increases the productivity, specially when this micronutrient is applied by foliar fertilization and promotes nitrogen uptake in this form. It was concluded that the suppression of nitrogen fertilization led to the reduction of nitrate accumulation. It may be also concluded, that for the same climatic conditions, lettuces of different varieties and/or lines accumulate different nitrate contents, being the line 'Emocion Rz' (var. *capitata*) the one that accumulates less nitrate and the line 'Ribai Rz' (var. *acephala*) the one that accumulates more.

**Key words:** Nitrate accumulation; reduction of nitrate; molybdenum; nitrate reductase; nitrate assimilation; Lettuce

## EXTENDED ABSTRACT

The main objective of the present study was an attempt of finding solutions to meet the needs of establishing effective agricultural practices in order to decrease nitrate accumulation in lettuce leaves.

For this, five experiments were performed: four field experiments, to assess in a practical context: (i) the effect of the foliar fertilization with molybdenum (Mo) in complement of fertirrigation on nitrate accumulation in lettuce leaves; (ii) nitrate accumulation in different lettuce varieties and/or lines, and (iii) the evolution of the soils characteristics; and one pot experiment to study, under controlled conditions, the (i) effect of foliar fertilization with Mo in complement of fertirrigation on nitrate accumulation in lettuce leaves (ii) and the influence of suppressing nitrogen fertilization.

Results obtained in the pot experiment showed that the addition of Mo to the fertilization plan led to a significant decrease of nitrate accumulation in lettuce leaves, and it is to note that lettuces that were fertilized with Mo showed much lower nitrate contents than those that were not subjected to this fertilization and also showed a significantly higher absorption rate.

On the other hand, no significant differences were found between the several methods used for Mo supply, water irrigation and/or foliar fertilization. Nevertheless, it was observed that although all lettuces fertilized with Mo tended to show a higher productivity, only the lettuces that were foliar fertilized with Mo achieved a significantly higher productivity. Thus, we can conclude that this method of supplying Mo allowed a more efficient use of this micronutrient by the lettuce plants.

It was found that suppressing nitrogen fertilization promote a reduction on nitrate accumulation in lettuce leaves. However, this reduction on lettuces fertilized with Mo achieved significantly values only after a period longer than one week while in lettuces where Mo was not applied this reduction occurred after three days. It is important to note that the final content of nitrates accumulated in any case tended to be higher in lettuces that were not fertilized with Mo. So, it can be concluded that the cut of nitrogen fertilization seems inducing a decrease of nitrate reductase activity and when this suppression occurs a week before harvest a reduction of productivity is observed.

It was also observed that nitrate accumulation significantly varied in lettuces of different varieties and lines produced in same edaphic, climatic and cultural conditions. The line 'Emocion Rz' of var. *capitata* accumulated the lowest nitrate content in the leaves while the 'Ribai Rz' of var. *acephala* accumulated the highest amount of nitrate.

**Key words:** Nitrate accumulation; reduction of nitrate; molybdenum; nitrate reductase; nitrate assimilation; lettuce

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. A CULTURA DA ALFACE	3
2.1. Enquadramento taxonómico e aspectos gerais	3
2.2. Produção mundial e nacional	4
2.3. Características botânicas e ciclos vegetativo e cultural	5
2.4. Condições edafo-climáticas	7
2.5. Necessidades da cultura em nutrientes	8
3. ASSIMILAÇÃO DO AZOTO	10
3.1. Absorção, translocação, armazenamento e distribuição dos nitratos nas plantas	10
3.1.1. Redução dos nitratos a amoníaco	12
3.1.2. Conversão do amoníaco a compostos azotados orgânicos	15
3.2. Acumulação de nitratos nas folhas de alface	15
3.2.1. Factores fisiológicos	16
3.2.2. Factores ambientais	16
3.2.3. Factores nutricionais	17
3.2.4. Interação entre factores que favorecem relevantemente a acumulação de nitratos	17
3.2.5. Limites máximos de resíduos de nitratos permitidos nas alfaces	18
4. CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE HUMANA DA INGESTÃO DE NITRATOS	20
4.1. Alface como fonte de exposição de nitratos e nitritos na dieta humana	20
4.2. Consumo diário aceitável de nitratos e nitritos (“acceptable daily intake”)	21
4.3. Metabolismo dos nitratos no corpo humano	22
4.4. Possíveis efeitos na saúde humana da ingestão de nitratos e nitritos	23
4.4.1. Efeitos toxicológicos da ingestão de nitratos na saúde humana	23
4.4.2. Efeitos benéficos da ingestão de nitratos na saúde humana	24

5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Ensaios de campo	26
5.1.1. Localização do ensaio	26
5.1.2. Delineamento experimental	27
5.1.3. Caracterização dos solos	28
5.1.4. Fertilização e rega	29
5.1.5. Dados meteorológicos	30
5.1.6. Amostragem	30
5.2. Ensaios em vasos	30
5.2.1. Localização do ensaio	30
5.2.2. Delineamento experimental	30
5.2.3. Caracterização do solo	31
5.2.4. Fertilização e rega	32
5.2.5. Dados meteorológicos	33
5.2.6. Amostragem	33
5.3. Metodologia	33
5.3.1. Análise de material vegetal e solo	33
5.3.2. Tratamento estatístico	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1. Resultados dos ensaios de campo	36
6.1.1. Efeitos da adubação foliar com molibdénium em complemento de uma adubação completa por fertirrega na redução da acumulação de nitratos	36
6.1.2. Acumulação de nitratos em diferentes variedades e linhas de alface.	42
6.1.3. Monitorização do solo da exploração	47
6.2. Resultados e discussão do ensaio em vasos	49
6.2.1. Efeitos da adubação foliar com molibdénium em complemento de uma adubação completa por fertirrega na redução da acumulação de nitratos	49

6.2.2. Efeitos do corte de adubação azotada antes da colheita	57
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9. ANEXOS	71



## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Asteráceas.	3
Quadro 2 - Composição média das folhas de alface por 100g de parte edível.	4
Quadro 3 - A cultura da alface* no Mundo	5
Quadro 4 - Características das diferentes variedades botânicas da alface.	6
Quadro 5 - Exportação total de nutrientes pela parte aérea da planta.	8
Quadro 6 - Níveis adequados de nutrientes na análise foliar da alface. Valores expressos na base de peso seco da folha mais velha não danificada no estado de 8 folhas.	9
Quadro 7 - Efeito do pré-tratamento com molibdénio em segmentos foliares de trigo na actividade da nitrato-redutase.	14
Quadro 8 - Limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface.	19
Quadro 9 - Fontes e estimativa de ingestão de nitratos ao nível global.	20
Quadro 10 - Classificação dos vegetais de acordo com o seu teor em nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ material fresco).	21
Quadro 11 - Variedades utilizadas no estudo da influência da variedade na acumulação de nitratos.	28
Quadro 12- Propriedades iniciais dos solos onde foram realizados os ensaios de campo	28
Quadro 13 - Composição da solução nutritiva e adubos utilizados na exploração.	29
Quadro 14 - Modalidades estudadas no ensaio no horto.	31
Quadro 15 - Características do solo utilizado no ensaio em vasos.	31
Quadro 16 - Composição das duas soluções nutritivas utilizadas.	32
Quadro 17 - Métodos de análise utilizados no presente estudo.	34
Quadro 18 - Testes e critérios utilizados na sua selecção.	35
Quadro 19 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg de NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) existente em cada modalidade de cada ensaio de campo, resultados do tratamento estatístico através do teste paramétrico T-student.	37
Quadro 20 - Datas de colheita das amostras nos diversos ensaios, teores máximos de nitratos acumulados nas amostras e limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface de acordo com a data de colheita.	37

Quadro 21 - Dados meteorológicos médios relativos a Temperatura média diária e Radiação média diária.	38
Quadro 22 - Valores médios de Peso seco (g) e de Peso fresco (g) por modalidade e ensaio, resultados do tratamento estatístico.	38
Quadro 23 - Teores de N, P, K, Ca e Mg nos tecidos da parte aérea e exportação, resultados do tratamento estatístico através do teste paramétrico T-student ou do teste não paramétrico Mann-Whitney (apenas quando surge ‘*’).	40
Quadro 24 - Teores médios de fósforo e de ferro ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontrados no solo do 1º e 2º ensaios de campo ao ar livre, respectivamente, e valores de significância atribuída pelo teste “t-student” à diferença entre modalidades.	41
Quadro 25 - Exportação média de nutrientes pela parte aérea das alfaces de cada ensaio e modalidade. Exportações de referência de acordo com a produção esperada.	41
Quadro 26 - Valores médios de nitratos acumulados na parte aérea das linhas de alfaces pertencentes às duas variedades estudadas.	42
Quadro 27 - Datas de colheita das amostras nos diversos ensaios, teores máximo de nitratos acumulados nas amostras e limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface de acordo com a data de colheita.	43
Quadro 28 - Valores médios relativos ao peso seco por alface (g) e das linhas e variedades estudadas, resultados do tratamento estatístico efectuado.	44
Quadro 29 - Comparação dos resultados das análises foliares com as exportações de cada elemento pelas diversas linhas e variedades de alfaces estudadas, resultados dos tratamentos estatísticos efectuados.	45
Quadro 30 - Exportação de elementos e produtividade dos diversos tipos de alface. Resultado dos testes estatísticos aplicados ao peso fresco.	46
Quadro 31 - Valores de referência para a exportação total de nutrientes pela parte aérea da planta.	46
Quadro 32 - Propriedades iniciais e finais do Regossolo Arico, solo onde foram realizados os ensaios de campo ao ar livre. Comparação entre os dois períodos.	47
Quadro 33 - Propriedades iniciais e finais do Calcissolo Leptico, solo onde foram realizados os ensaios de campo em estufa. Comparação entre os dois períodos.	48
Quadro 34 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades e definição das modalidades significativamente diferentes.	50

Quadro 35 - Teores médios de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) e de azoto nítrico solo ( $\text{mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de terra fina) das diversas modalidades e definição de diferenças significativas entre modalidades.	51
Quadro 36 - Peso seco médio (g) de cada alface e diferenças significativas existentes entre as diversas modalidades.	53
Quadro 37 - Teores médios de elementos (%) presentes nos tecidos da parte aérea das alfaces das quatro modalidades e exportações médios ( $\text{mg vaso}^{-1}$ ) efectuadas pelas mesmas.	54
Quadro 38 - Concentração média de proteínas contidas nos extractos e respectivas produções médias de nitritos por hora.	56
Quadro 39 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades e definição das modalidades significativamente diferentes.	57
Quadro 40 - Teores médios de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) e solo ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de terra fina) das diversas modalidades e definição de diferenças significativas entre modalidades.	58
Quadro 41 - Valores médios de Peso seco (g) e Peso fresco (g) em cada modalidade.	59
Quadro 42 - Teores médios de elementos (%) presentes nos tecidos da parte aérea das alfaces das quatro modalidades e exportações médios ( $\text{mg vaso}^{-1}$ ) efectuadas pelas mesmas.	60
Quadro 43 - Concentração média de proteínas contidas nos extractos e respectivas produções médias de nitritos por hora.	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da assimilação dos nitratos (baseado em Maathuis, 2009).	10
Figura 2 - Mecanismos de transporte dos nitratos (adaptado de Forde, 2000 e Varennes, 2003).	11
Figura 3 - Modelo estrutural e funcional da enzima nitrato-redutase (adaptado de Maldonado et al, 2000 e Mengel et al, 2001).	13
Figura 4 - Ciclo de GS-GOGAT (adaptado de Maldonado et al, 2000).	15
Figura 5 - Metabolismo dos nitratos e nitritos no corpo humano (adaptado de Heitor, 2000; Shao-ting et al, 2007; Hord et al, 2009).	22
Figura 6 - Localização dos ensaios de campo (A- Localização dos ensaios campo ao ar livre; B- Localização dos ensaios de campo em estufa).	26
Figura 7 - Esquematização do posicionamento e distribuição dos talhões de ensaio. (D1 – Distribuição das alfases nos talhões de ensaios de campo realizados ao ar livre; D2 – Distribuição das alfases nos talhões de ensaio de campo realizados em estufa).	27
Figura 8 - Esquema da distribuição das modalidades do ensaio de vasos.	31
Figura 9 - Corte transversal de 'Forlina Rz' (A) e 'Emocion Rz' (B).	43
Figura 10 - Ilustração do aspecto visual das alfases de cada modalidade	49

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) das duas modalidades no 1º ensaio de campo em ar livre.	36
Gráfico 2 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) das duas modalidades no 2º ensaio de campo em ar livre.	36
Gráfico 3 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) das duas modalidades no 1º ensaio de campo em estufa.	36
Gráfico 4 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) das duas modalidades no 2º ensaio de campo em estufa.	36
Gráfico 5 - Peso fresco (g) das modalidades do 1º ensaio de campo em estufa.	39
Gráfico 6 - Peso fresco (g) das modalidades do 1º ensaio de campo em ar livre.	39
Gráfico 7 - Resultados do peso seco (g) obtidos no 2º ensaio de campo.	44
Gráfico 8 - Teor de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades.	50
Gráfico 9 - Teor de azoto nítrico acumulado no solo das diversas modalidades ( $\text{mg de N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de terra fina).	51
Gráfico 10 - Resultado do peso seco (g) das diversas modalidades.	52
Gráfico 11 - Teor de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades.	57
Gráfico 12 - Teor de azoto nítrico ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de terra fina) acumulados nos solos das diversas modalidades.	58

## 1. INTRODUÇÃO

O azoto é o macronutriente que com maior frequência se encontra em deficiência nos solos funcionando nessas situações como agente limitante do crescimento vegetal. Para prevenir estes contextos de carência é essencial que se proceda a uma adequada fertilização azotada, planeada de acordo com as exigências nutritivas de cada cultura. No entanto, alguns produtores sabendo que este elemento promove o crescimento vegetativo e o vigor das plantas, tendem a fornecê-lo em excesso às culturas como garantia de rentabilidade.

As culturas hortícolas de folhas (vulgarmente designadas por hortícolas de folhas) são aquelas em que o fenómeno acima descrito pode ocorrer com maior notoriedade e, de entre estas, a cultura da alface é uma das mais preocupantes dada a sua importância na dieta humana e a sua afinidade para a acumulação de nitratos. Com efeito, devido à capacidade das plantas para absorver azoto na forma nítrica ( $\text{N-NO}_3$ ) acima das suas necessidades, os aumentos de rendimento inerentes aos excessos praticados na adubação azotada tendem a promover a acumulação de elevados teores de nitratos nos vacúolos das folhas de alface.

Os receios em relação a este aspecto fundamentam-se, essencialmente, em estudos que associam uma dieta rica em nitratos a problemas graves de saúde, tais como as neoplasias gástricas e a metahemoglobinémia infantil. Esta é, contudo, uma associação que tem gerado alguma polémica pois, se por um lado existem artigos científicos que contrariam claramente esta ligação baseando-se em análises críticas dos referidos estudos, por outro, existem pesquisas que demonstram a existência de efeitos benéficos para a saúde humana decorrentes da ingestão de nitratos. Perante esta indecisão e como forma de prevenção, dada a falta de estudos suficientes que demonstrem, nomeadamente os efeitos nefastos na saúde humana da ingestão prolongada de elevados teores de nitratos, foram recomendados limites para o consumo diário de nitratos e estabelecidos limites máximos para a sua acumulação nos vegetais.

Perante este contexto, ao longo das últimas décadas têm sido desenvolvidos esforços pela comunidade científica para encontrar formas de minimizar a acumulação de nitratos, procurando esclarecer quais os factores e respectivos mecanismos de que depende a absorção, assimilação e acumulação dos nitratos nas plantas. Estes estudos permitiram concluir que o molibdénio (Mo) é um cofactor da enzima responsável pela redução dos nitratos, a nitrato-redutase, e também que a sua deficiência limita a actividade desta enzima, promovendo a acumulação de nitratos na planta.

O presente trabalho surge, assim, com o principal objectivo de responder à necessidade de se estabelecerem práticas culturais que promovam a redução da acumulação de nitratos nas folhas de alface. Para atingir este objectivo estabeleceram-se os seguintes objectivos secundários:

- Estudar a aplicação foliar de Mo como complemento da sua aplicação em fertirrega;

- Averiguar os efeitos da supressão da adubação azotada antes da colheita;
- Analisar a acumulação de nitratos em diferentes variedades e linhas de alface;
- Monitorizar o solo da exploração onde foram instalados os ensaios de campo.

## 2. A CULTURA DA ALFACE

### 2.1. Enquadramento taxonómico e aspectos gerais

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea anual, pertencente à família *Asteraceae*, anteriormente conhecida por *Compositae* (quadro 1), a maior família das dicotiledóneas. Comummente é designada como uma hortícola de folhas.

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Asteráceas.

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>	<b>Ordem</b>	<i>Asterales</i>
<b>Sub-reino</b>	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)	<b>Família</b>	<i>Asteraceae</i> (sin. <i>Compositae</i> )
<b>Superdivisão</b>	<i>Spermatophyta</i> (Plantas com semente)	<b>Subfamília</b>	<i>Cichorioideae</i>
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospérmicas)	<b>Tribo</b>	<i>Lactuceae</i> (sin <i>Cichorueae</i> )
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)	<b>Género</b>	<i>Lactuca</i> L.
<b>Subclasse</b>	<i>Asteridae</i>	<b>Espécie</b>	<i>Lactuca sativa</i> L.

Fonte: Almeida (2006)

A *Lactuca sativa* é a única espécie do género *Lactuca* domesticada. De acordo com Kuang *et al.* (2008), o seu centro de origem ocorreu no Próximo Oriente e Mediterrâneo e provavelmente será descendente da espécie selvagem *Lactuca serriola* L. Esta espécie, tal como outras espécies selvagens deste género que podem cruzar com a alface doméstica, apresenta caules e folhas espinhosas, não possui repolho, tem um gosto amargo e contém uma grande abundância de látex.

A sua domesticação ocorreu por altura de 2500 a.C. no Antigo Egipto, onde era cultivada para extracção do óleo das sementes, mas foram os gregos e os romanos que a inseriram na sua dieta. Actualmente a alface é o produto hortícola mais consumido em saladas e é considerado um componente primordial nos produtos processados. As suas folhas são ricas em fibras, vitaminas (A e C), minerais e essencialmente água (quadro 2).

A sua domesticação, de acordo com Rubatzky & Yamaguchi (1999) e Almeida (2006), implicou diversas alterações ao nível da morfologia e fisiologia da alface silvestre, tal como aumento do tamanho dos aquénios, perda de pilosidade, aumento do número e da área das folhas, formação de repolho e redução da acumulação de látex.



As variedades actuais possuem resistência ou tolerância a determinados inimigos chave da cultura e resultam de cruzamentos da alface doméstica com a *Lactuca serriola*, a *Lactuca saligna* e *Lactuca virosa*.

**Quadro 2 - Composição média das folhas de alface por 100g de parte edível.**

	<b>Var. capitata</b>		<b>Var. longifolia</b>	<b>Var. acephala</b>	
	<i>Butterhead</i>	<i>Iceberg</i>		Folha verde	Folha roxa
Água (%)	95,63	95,64	94,61	94,98	95,64
Energia (kcal)	13,00	14,00	17,00	15,00	16,00
Proteína (%)	1,35	0,90	1,23	1,36	1,33
Gordura (%)	0,22	0,14	0,30	0,15	0,22
Hidratos de carbono (%)	2,23	2,97	3,29	2,87	2,26
Fibra (%)	1,10	1,20	2,10	1,30	0,90
Vitamina A (UI)	3312	502	8710	7405	7492
Tiamina (mg)	0,057	0,041	0,072	0,070	0,064
Riboflavina (mg)	0,062	0,025	0,067	0,080	0,077
Niacina (mg)	0,357	0,123	0,313	0,375	0,321
Ácido ascórbico (mg)	3,7	2,8	4,0	9,2	3,7
Vitamina B6 (mg)	0,082	0,042	0,074	0,090	0,100
Potássio (mg)	238	141	247	194	187
Cálcio (mg)	35	18	33	36	33
Magnésio (mg)	13	7	14	13	12
Sódio (mg)	5	10	8	28	25
Ferro (mg)	1,24	0,41	0,97	0,86	1,20
Fósforo (mg)	33	20	30	29	28

Fonte: USDA National Agricultural Library (2011).

## 2.2. Produção mundial e nacional

Devido às exigências climáticas da espécie, a produção concentra-se apenas nas zonas temperadas do Hemisfério Norte, localizando-se os principais produtores na Califórnia, China, Espanha e Itália (quadro 3). Em Portugal, segundo o Diagnóstico Sectorial desenvolvido pelo Gabinete de Planeamento e Políticas do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (GPP, 2007), a produção de alface tem maior importância nas regiões do Ribatejo e Oeste, Entre Douro e Minho e Beira Litoral.

De acordo com os dados da FAO disponíveis, a produção mundial de alface em 2009 estimava-se em 23,7 milhões de toneladas, distribuídas por uma superfície de aproximadamente 1 milhão de hectares. A China é o maior produtor mundial de alface, com uma produção anual de cerca de quase

13 milhões de toneladas, o que representa aproximadamente 54% da produção mundial. Seguem-se-lhe os Estados Unidos da América (principalmente a Califórnia) com 17%, representando a Europa apenas 4% da produção mundial, sendo a Espanha e a Itália os principais produtores. As produtividades médias de alface, nos vários Continentes são muito diferentes, rondando as 22,4 t ha<sup>-1</sup> na Europa, 23,5 t ha<sup>-1</sup> na Ásia e 20,3 t ha<sup>-1</sup> na América do Norte.

Em 2004, ainda de acordo com o Diagnóstico sectorial, a cultura da alface detinha 9% da produção total de produtos hortícolas e representava 12% das exportações, não considerando a batata e o tomate para indústria.

**Quadro 3 - A cultura da alface\* no Mundo.**

	Área (x 1000 ha)	Produção (x 1000 t)	Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )
<b>Mundo</b>	1 057,71	23 733,80	22,4
Europa	141,73	3 338,41	23,5
Ásia	739,55	15 068,73	20,3
América do Norte	115,58	4 212,66	36,4
América Central	16,71	342,75	20,5
América do Sul	19,02	274,13	14,4
África	14,50	281,96	19,4
Oceânia	8,70	197,24	22,6
<b>Principais países produtores</b>			
1º China	550,26	12 855,50	23,4
2º Estados Unidos da América	110,97	4 104,44	36,9
3º Espanha	32,40	1 000,00	30,9
4º Itália	-	-	19,3
5º Índia	-	-	6,6
6º Japão	20,00	535,00	26,7
7º Turquia	23,00	438,04	19,0
8º França	16,00	430,00	26,9
9º Alemanha	15,00	320,00	21,3
10º México	-	-	21,4
15º Portugal	4,55	102,30	22,5

\*Inclui a alface (*Lactuca sativa*), a chicória witloof (*Cichorium intybus*) e a escarola (*C. endívia*).

Fonte: FAOSTAT (2011).

### 2.3. Características botânicas e ciclos vegetativo e cultural

A alface apresenta um sistema radicular aprumado, pouco ramificado e relativamente superficial. A raiz principal, nas culturas obtidas por sementeira directa, atinge a profundidade de 60 cm, mas, segundo Rubatzky & Yamaguchi (1999) e Almeida (2006), são as raízes que se encontram nos

primeiros 30 cm de profundidade do solo as grandes responsáveis pela absorção de água e nutrientes. Já nas culturas instaladas por transplantação o sistema radicular não explora mais do que os primeiros 10 a 25 cm de profundidade do solo, possuindo um sistema radicular mais superficial do que as plantas obtidas por sementeira directa.

A parte aérea é muito polimórfica distinguindo-se cinco variedades botânicas cujas características se descrevem no quadro 4. Em geral, apresenta um caule curto, excepto na variedade *asparagina*, com as folhas dispostas em roseta, sendo estas inicialmente alongadas aumentando a sua área foliar aquando do início do crescimento vegetativo.

**Quadro 4 - Características das diferentes variedades botânicas da alface.**

<b>Variedade botânica</b>	<b>Tipo de cultivar</b>	<b>Características</b>
Var. <i>capitata</i>	Bola de manteiga ( <i>butterhead</i> )	Alface de repolho arredondado, pouco compacto, folhas lisas, tenras e de nervação perinérvea.
	Batávia ( <i>crisphead</i> )	Alface de repolho arredondado ou ovóide, de folhas crespas com margens sinuosas ou recortadas.
	Tipo <i>Iceberg</i>	Batávias americanas cujo repolho é compacto e está nitidamente separado das folhas externas.
Var. <i>longifolia</i>	Romana	Folhas lisas, alongadas, erectas, com a nervura principal saliente e quebradiça. Não forma um verdadeiro repolho, mas as folhas do centro da planta podem formar um agrupamento oblongo e pouco compacto.
Var. <i>acephala</i> (sin. var. <i>crispa</i> )	Acéfala ou de corte	Não forma repolho, folhas morfológicamente distintas, inteiras ou lobadas.
	Tipo <i>Lollo</i>	Folhas com margens finamente frisadas.
	Tipo <i>Folha de carvalho</i>	Folhas com lobos arredondados.
Var. <i>asparagina</i> (sin. var. <i>augustana</i> )	De caule	Alfaces que não formam repolho e possuem um caule carnudo.

Fonte: Almeida (2006).

No anexo 1 encontra-se disponibilizadas fotografias que ilustram a maioria das diferentes variedades descritas no quadro anterior.

Na fase reprodutiva, o caule alonga-se e forma uma haste floral ramificada em corimbo. As flores são hermafroditas e possuem pétalas amarelas. A polinização é predominantemente autogâmica e o fruto é um aquénio com 3 a 5 mm de comprimento.

As alfaces podem ser classificadas de acordo com: as variedades botânicas, os tipos de cultivar, o aspecto e cor das folhas (lisas ou frisadas, verdes ou vermelhas/roxas), a aptidão para formar repolho, a adaptação à época de cultura (Outono-Inverno ou Primavera-Verão), a aptidão para sistema de cultura (ar livre ou estufa) e a susceptibilidade à necrose marginal e resistência a doenças.

O ciclo vegetativo da alface compreende 5 períodos: germinação e emergência, formação da roseta de folhas, crescimento vegetativo ou fase de formação de repolho, espigamento e floração e maturação dos aquénios. No entanto o ciclo cultural termina no período inicial da formação de repolho. Este ciclo tem a duração de 6 a 8 semanas na época de Primavera – Verão e 10 a 12 semanas durante o período Outono – Inverno.

É de realçar que nas culturas intensivas, principalmente na Europa, se recorre usualmente à técnica da transplantação, onde a alface é “plantada” preferencialmente na fase final da emergência ou na fase inicial de formação da roseta. Esta técnica permite um encurtamento do ciclo cultural em cerca de 2 a 3 semanas, em relação à sementeira directa. No entanto, de acordo com Almeida (2006), apresenta como inconvenientes o facto do sistema radicular explorar um volume de solo reduzido e de implicar a existência de um período de *stress* (“crise da transplantação”).

## **2.4. Condições edafo-climáticas**

A cultura da alface adapta-se a uma ampla gama de climas, embora de acordo com Maroto (2002), prefira climas temperados e húmidos. Esta preferência permite que as diversas variedades de alface se adaptem facilmente às condições climáticas de Portugal, em qualquer época do ano.

Segundo Lopes & Simões (2006) as temperaturas médias ideais para a maioria das cultivares de alface variam entre os 15 e os 20°C. Temperaturas médias inferiores a 7 °C afectam o seu crescimento foliar, sendo muito reduzido, e temperaturas muito elevadas promovem a existência de repolhos frouxos e a indução floral, prejudicando a qualidade da alface. Casos extremos de temperatura, superiores a 33°C, tornam as folhas amargas.

Segundo Maroto (2002) e Almeida (2006), as alfaces podem ser cultivadas com sucesso em qualquer tipo de solo, embora exista uma preferência por solos bem drenados e ricos em matéria orgânica, o que poderá justificar-se pelo facto de a cultura possuir um fraco desenvolvimento do sistema radicular e um rápido crescimento vegetativo, tendo necessidade de nutrientes facilmente disponíveis.

Por outro lado, a alface apresenta uma tolerância moderadamente sensível à salinidade, máximo de  $1,3 \text{ mScm}^{-1}$  (Maas & Hoffman, 1977), e é considerada sensível à acidez do solo, estando o intervalo ótimo de pH para o seu desenvolvimento compreendido entre 6,5 e 7,2 (Almeida, 2006).

## 2.5. Necessidades da cultura em nutrientes

A cultura da alface caracteriza-se por apresentar um desenvolvimento vegetativo rápido, o que de acordo com Almeida (2006), associado a um sistema radicular pouco desenvolvido conduz à necessidade de existirem nutrientes disponíveis na proximidade da zona radicular em formas passíveis de serem rapidamente absorvidas.

Desta forma para que ocorra um fornecimento adequado de nutrientes devem compensar-se as exportações reais e as perdas técnicas, tal como defende Amaro (2003). No quadro 5 apresentam-se os valores das exportações totais de macronutrientes para as variedades: batávia, romana e acéfala.

**Quadro 5 - Exportação total de nutrientes pela parte aérea da planta.**

Variedade	Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )	N (kg ha <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg ha <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (kg ha <sup>-1</sup> )	CaO (kg ha <sup>-1</sup> )	MgO (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>capitata</i> (Batávia)	20	60	20	100	-	-
	34	63	25	137	17	5
	42	80	40	170	40	10
	57	109	91	221	55	13
<i>longifolia</i> (Romana)	25	53	20	120	-	-
<i>acephala</i> (Acéfala)	25	52	20	50	-	-

Fonte: adaptado de Maroto (2002); Santos (2002); Almeida (2006).

Ao analisar o quadro anterior verifica-se que as exigências em azoto, fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e potássio (K<sub>2</sub>O) de cada variedade de alface para uma produção da ordem das 20/25 t ha<sup>-1</sup>, são muito semelhantes, exceção feita às exportações de potássio das alfaces acéfalas que corresponde a quase metade das necessidades das batávias ou das romanas.

Durante o processo de cálculo das necessidades de fertilização há ainda que conjugar as necessidades nutricionais para uma determinada produtividade esperada com os resultados analíticos das amostras de solo (Lopes *et al*, 2006).

Devido ao facto desta cultura em condições de baixa luminosidade ser susceptível de acumular excesso de azoto, Almeida (2006) aconselha a redução da adubação azotada nas culturas de Outono – Inverno e o estabelecimento de uma relação  $K_2O/N$  de cerca de 4 na cultura de Inverno e 3 na de Primavera.

De forma a auxiliar as tomadas de decisão em relação à adubação, em 2007, Maynard & Hochmuth, disponibilizaram as percentagens de nutrientes que se devem obter para a análise foliar nas diversas variedades de alface, definindo quais as percentagens que indicam um nível deficiente, adequado ou elevado de cada elemento (quadro 6).

**Quadro 6 - Níveis adequados de nutrientes na análise foliar da alface. Valores expressos na base de peso seco da folha mais velha não danificada no estado de 8 folhas.**

<b>Macronutriente</b>	<b>Valores (%)</b>		<b>Micronutriente</b>	<b>Valores (%)</b>	
	<b>Batávia</b>	<b>Romana</b>		<b>Batávia</b>	<b>Romana</b>
<b>N</b>	4,0-5,0	5,0-6,0	<b>Fe</b>	50-150	50-150
<b>P</b>	0,4-0,6	0,35-0,8	<b>Mn</b>	20-40	15-25
<b>K</b>	5,0-7,0	5,0-6,0	<b>Zn</b>	25-50	20-50
<b>Ca</b>	0,8-2,0	0,8-3,0	<b>B</b>	15-30	30-45
<b>Mg</b>	0,3-0,5	0,25-0,35	<b>Cu</b>	5-10	5-10
<b>S</b>	0,3-0,8	0,3-0,8	<b>Mo</b>	0,1-0,4	0,1-0,4

Fonte: Maynard & Hochmuth (2007).

### 3. ASSIMILAÇÃO DO AZOTO

O azoto é um dos elementos essenciais para as plantas, fazendo parte da estrutura de inúmeras moléculas orgânicas indispensáveis ao seu metabolismo, tais como: todos os aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e coenzimas (Mengel *et al*, 2001; Varennes, 2003). As plantas têm a capacidade de absorver duas fontes minerais de azoto, a forma amoniacal e a forma nítrica.

No que se refere à forma nítrica, as plantas conseguem reduzir os iões nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) incorporando-os em moléculas orgânicas (figura 1). Este processo denomina-se de assimilação dos nitratos e compreende as seguintes fases: (i) absorção; (ii) redução dos nitratos a amoníaco e por fim (iii) conversão em formas orgânicas de N (Maldonado *et al*, 2000).

Os nitratos, para além de fornecerem N, e em particular no caso das espécies nitrofílicas, como são os espinafres, desempenham ainda um papel importante na osmorregulação celular (Seginer *et al*, 1999; Chen *et al*, 2004; Chung *et al*, 2005), especialmente em condições de baixa intensidade luminosa (Pavlou *et al*, 2007), e no equilíbrio entre catiões e aniões, funcionando como contra-ião dos catiões no xilema (Varennes, 2003).

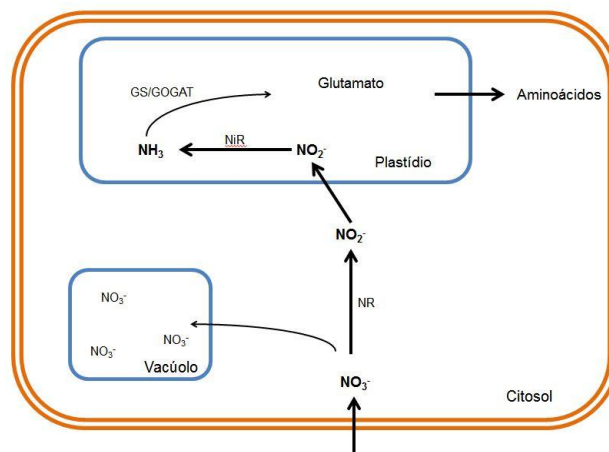


Figura 1 - Esquema geral da assimilação dos nitratos (baseado em Maathuis, 2009).

#### 3.1. Absorção, translocação, armazenamento e distribuição dos nitratos nas plantas

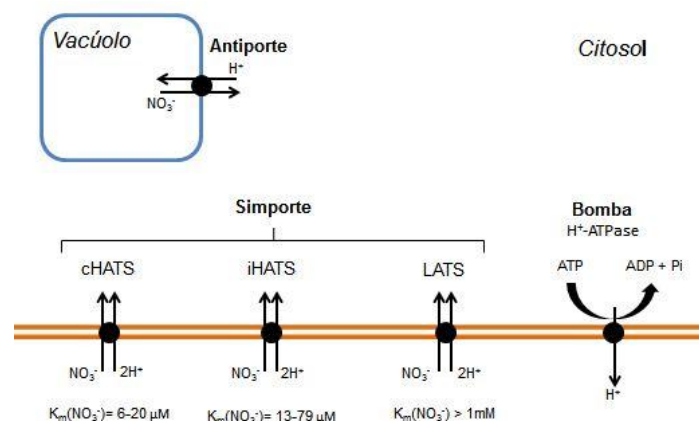
A absorção dos nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ ) ocorre ao nível da membrana plasmática da epiderme das células corticais das raízes, através de um mecanismo de simporte  $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  (Forde, 2000; Maldonado *et al*, 2000; Miller *et al*, 2004). A manutenção do gradiente do potencial electroquímico de  $\text{H}^+$ , essencial para permitir o simporte, é realizada por acção de uma bomba de protões ( $\text{H}^+$ -ATPase) dependente do fornecimento de Adenosina Trifosfatada – ATP (Maldonado *et al*, 2000; Miller *et al*, 2004).

Existem três tipos de sistemas de transporte de nitratos (figura 2): dois de elevada afinidade – os *high-affinity transport systems* (HATS) – que englobam os sistemas induzidos por nitratos existentes no meio externo (iHATS) e os sistemas constitutivos (cHATS) que se encontram disponíveis nas plantas mesmo na ausência de nitratos; e um outro de baixa afinidade – o *low-affinity transport systems* (LATS) (Forde, 2000; Miller *et al*, 2004; Orsel *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006; Jackson *et al*, 2008).

Estes tipos de transportadores apresentam diferenças ao nível da capacidade e da velocidade de absorção de nitratos. Assim, os transportadores de elevada afinidade são capazes de absorver nitratos a partir de uma concentração exterior muito reduzida (cHATS – valores da constante de Michaelis ( $K_m$ ) que variem entre 6 – 20  $\mu\text{M}$ ; iHATS – valores de  $K_m$  que variem entre 13 – 79  $\mu\text{M}$ ) a velocidades de absorção inferiores caso dos LATS, que são muito importantes quando as concentrações externas de nitratos são superiores a 1mM (Forde 2000; Wang *et al*, 2006) (figura 2).

Após a absorção dos nitratos três cenários podem acontecer. Pode verificar-se o efluxo dos nitratos, permitindo a sua redistribuição pela rizosfera de modo a manter elevadas concentrações junto à superfície radicular (Gorska *et al*, 2008); pode observar-se a sua redução na raiz, embora a redução ocorra de forma mais eficaz nas folhas (Chen *et al*, 2004); por fim, a maior percentagem de nitratos absorvidos pode ser transportada pelo xilema até às folhas onde são armazenados nos vacúolos e/ou reduzidos no citosol (Forde, 2000; Chen *et al*, 2004).

Os nitratos que se encontram armazenados nos vacúolos das folhas, 90% do total existente na folha, são libertados à medida que aumenta a sua carência no citosol (Chen *et al*, 2004; Ott *et al*, 2008), garantindo assim uma manutenção adequada e constante dos teores de nitratos (Forde, 2000). Pensa-se que esta passagem pelo tonoplasto seja feita pelo mecanismo de antiporte com  $\text{H}^+$  (Miller *et al*, 2004) (figura 2).



**Figura 2 - Mecanismos de transporte dos nitratos (adaptado de Forde, 2000 e Varennes, 2003).**



Esta forma de azoto mineral não possui a capacidade de se transportar no floema, pelo que quando a planta necessita de translocar azoto de um local para outro, como por exemplo de folhas mais velhas para folhas mais novas, tem de utilizar formas orgânicas de azoto, nomeadamente aminoácidos (Mengel *et al*, 2001). Por esse motivo, os nitratos armazenados nos vacúolos de folhas completamente expandidas (onde a capacidade redutora é baixa) não conseguem translocar-se para outras partes da planta, permanecendo armazenados (Varennnes, 2003).

Em geral, o sistema radicular da alface tende a apresentar teores de nitratos mais baixos que a parte aérea. Na parte aérea, o pecíolo e o caule tendem a acumular mais nitratos que as folhas (Chen *et al*, 2004; Shao-ting *et al*, 2007; Ott *et al*, 2008). No entanto, nas situações em que os teores de nitratos na planta são baixos o sistema radicular tende a acumular maiores quantidades de nitratos que a parte aérea (Shao-ting *et al*, 2007).

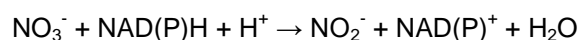
### 3.1.1. Redução dos nitratos a amoníaco

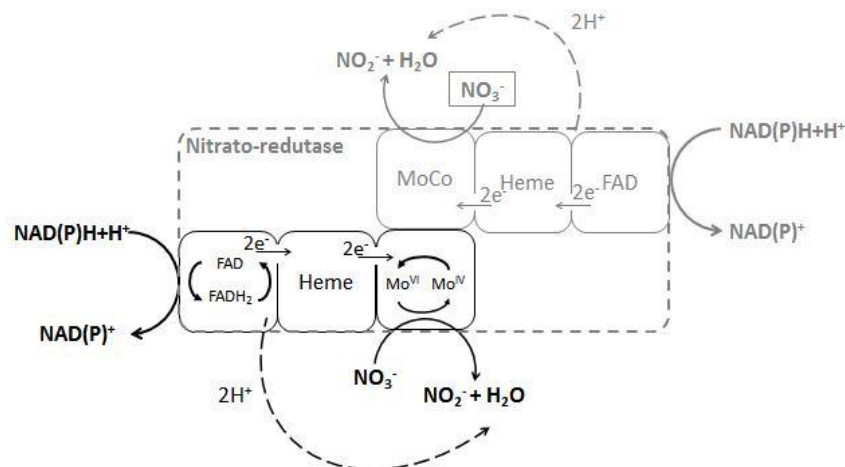
No processo de assimilação do azoto na forma nítrica a primeira etapa é considerada como limitante da capacidade de assimilação planta (Chen *et al*, 2004), ou seja, os nitratos que não sejam reduzidos pela nitrato-redutase a nitritos não são assimilados permanecendo retidos nos vacúolos das plantas.

A redução dos nitratos a amoníaco é realizada em duas etapas sequenciais: a primeira inclui a redução dos nitratos a nitritos e, a segunda, a redução dos nitritos a amoníaco. Cada etapa é catalisada por uma enzima, a nitrato redutase (NR), no citosol das células da raiz ou do mesófilo das folhas (Heldt, 1997; Varennnes, 2003), e a nitrito redutase (NiR), respectivamente.

A nitrato-redutase é um homodímero constituído por duas subunidades idênticas compostas por três grupos prostéticos (figura 3): um grupo heme (com ferro), uma flavina-adenina-dinucleótido (FAD) e o cofactor molibdénio (MoCo) (Maldonado *et al*, 2000; Mengel *et al*, 2001; Varennnes, 2003; Miller, 2004).

A enzima nitrato-redutase reduz os iões nitrato a nitritos através de uma série de reacções, em que os grupos prostéticos sofrem primeiro uma redução e depois são novamente oxidados, quando os electrões passam através deles, da NAD(P)H (nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada), para o ião nitrato. Assim, o grupo FAD aceita do poder redutor, que se encontra vinculado, dois átomos de H que são divididos em  $2H^+$  e  $2e^-$  (Mengel *et al*, 2001); os electrões são transferidos através dos grupos prostéticos até ao ião nitrato, vinculado pelo MoCo, promovendo desta forma a redução dos nitratos a nitritos (Taiz *et al*, 1998; Maldonado *et al*, 2000; Mengel *et al*, 2001; Varennnes, 2003). A equação geral desta reacção é a seguinte:





**Figura 3 - Modelo estrutural e funcional da enzima nitrato-redutase (adaptado de Maldonado et al, 2000 e Mengel et al, 2001).**

Existem duas fontes possíveis de poder redutor para a nitrato-redutase, a NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) e a NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada), e três tipos de enzimas nitrato redutase (Miller *et al*, 2004): um que apenas utiliza como dador de electrões a NADH, que são as enzimas mais comuns (Taiz *et al*, 1998; Maldonado *et al*, 2000; Miller *et al*, 2004); outro que utiliza a NADPH, que se encontra em tecidos “não verdes”, como por exemplo as raízes (Taiz *et al*, 1998); e finalmente um tipo que é capaz de vincular os dois tipos de poder redutor. De acordo com Mengel *et al* (2001) existe um pequeno número de enzimas com a capacidade de utilizar os dois tipos de poder redutor.

A alface, sendo uma planta herbácea, apresenta uma taxa de redução tendencialmente superior nas folhas (Heldt, 1997), pois a redução nas raízes envolve um maior dispêndio energético e também porque existe uma maior disponibilidade quer energética (ATP – adenosina trifosfatada), quer de poder redutor quer de carbono nas folhas (Forde, 2000; Varennes, 2003; Chen *et al*, 2004).

O molibdénio (Mo) é um micronutriente anião essencial à actividade da nitrato-redutase. Este micronutriente encontra-se complexado por um tipo de pterina (metaloproteína) denominada por molibdopterina, formando o grupo prostético MoCo, cofactor molibdénio (Mendel, 2007; Min *et al*, 2010). É só nesta forma que o Mo se encontra activo na planta e é o MoCo que é responsável pela actividade catalítica da nitrato-redutase (Mendel, 2007).

Os teores de molibdénio na planta estão directamente correlacionados com a sua disponibilidade no solo, sendo que esta disponibilidade diminui em solos com pH elevado causando deficiência na planta (Mendel, 2007). Nestas situações verifica-se a acumulação de nitratos e a diminuição da

concentração de aminoácidos e outros compostos azotados (Mengel *et al*, 2001) devido à reduzida actividade da nitrato-redutase e consequente falta de amoníaco (Mengel *et al*, 2001; Marschner, 2002; Varennes, 2003).

De acordo com Min *et al* (2010) o fornecimento de Mo promove a actividade da nitrato-redutase e a redução da concentração de nitratos. O mesmo já foi demonstrado por Randall em 1969 (quadro 7), cujos resultados foram publicados por Marschner (2002). Min *et al* (2010) referem ainda que o fornecimento de molibdénio promove a absorção de azoto.

**Quadro 7 - Efeito do pré-tratamento com molibdénio em segmentos foliares de trigo na actividade da nitrato-redutase.**

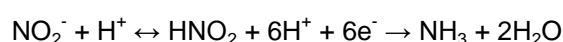
Fornecimento de molibdénio durante o desenvolvimento da planta (µg por planta)	Pré-tratamento de segmentos foliares (µg Mo L <sup>-1</sup> )	Actividade da nitrato-redutase (µmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> peso fresco) ao fim de:	
		24 h	70 h
0,005	0	0,2	0,3
0,005	100	2,8	4,2
5,0	0	-	8,0
5,0	100	-	8,2

Fonte: Marschner (2002).

A segunda etapa da redução dos nitratos ocorre nos plastídios, no protoplasto se for na raiz e nos cloroplastos se ocorrer na folha (Heldt, 1997), por acção da enzima nitrito-redutase. Esta redução ocorre imediatamente a seguir à redução dos nitratos, pois os nitritos são tóxicos para as plantas quando se encontram em elevadas quantidades (Varennes, 2003).

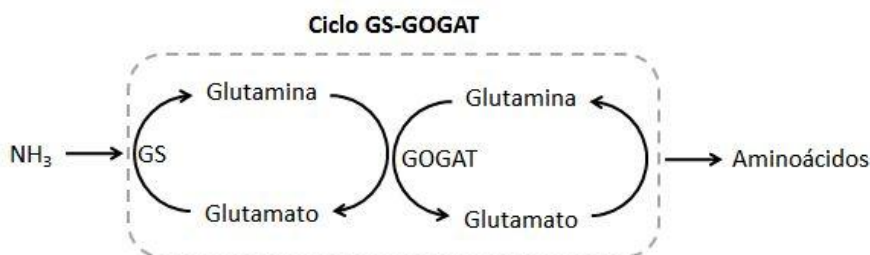
Esta enzima é um monómero composto por dois grupos prostéticos: o centro sulfoférico (4Fe – 4S); uma FAD e um siroheme (Maldonado *et al*, 2000). Esta enzima pode utilizar como dador de electrões dois tipos diferentes de transportadores: a ferredoxina (Heldt, 1997; Varennes, 2003), que é uma proteína que contém ferro derivada da fotossíntese; ou em menor expressão a NADPH, durante os períodos nocturnos em que não existe disponível a ferredoxina (Heldt, 1997).

Assim, o ião nitrito parcialmente protonado no citosol, recebe seis electrões originários da ferredoxina transferidos pelos grupos prostéticos e é reduzido a amoníaco no plastídio (Heldt, 1997; Maldonado *et al*, 2000; Mengel *et al*, 2001; Varennes, 2003):



### 3.1.2. Conversão do amoníaco a compostos azotados orgânicos

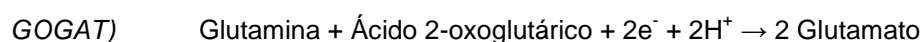
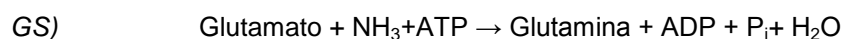
O amoníaco resultante da redução dos nitratos, ou de qualquer outra origem, é assimilado por meio de duas enzimas que actuam em série: a glutamina-sintetase (GS) e a glutamato-sintase (GOGAT). Este processo denomina-se por ciclo de GS-GOGAT (figura 4) (Maldonado *et al*, 2000; Mengel *et al*, 2001; Miller *et al*, 2004).



**Figura 4 - Ciclo de GS-GOGAT (adaptado de Maldonado *et al*, 2000).**

A acção da enzima glutamina-sintetase é dependente de ATP e também de  $Mg^{2+}$  (Mengel *et al*, 2001), na primeira fase (GS) do ciclo, e necessita de um dador de electrões, ferredoxina ou NAD(P)H, na segunda fase do ciclo (GOGAT) (Maldonado *et al*, 2000).

As reacções que ocorrem no ciclo de GS-GOGAT podem ser sintetizadas pelas seguintes equações (Varennnes, 2003):



A glutamina é um dos principais compostos transportadores de azoto pelas plantas (Maldonado *et al*, 2000), utilizando o floema para se deslocar (Heldt, 1997).

### **3.2. Acumulação de nitratos nas folhas de alface**

A acumulação de nitratos nas plantas, nomeadamente nas folhas, resulta de uma absorção de nitratos superior à capacidade da planta os reduzir e posteriormente assimilar (López-Mosquera *et al*, 2004; Weightman *et al*, 2006; Shao-ting *et al*, 2007; Salomez *et al*, 2009; Pardo-Marín *et al*, 2010).

Estes mecanismos podem ser influenciados por inúmeros factores, uns que actuam essencialmente ao nível da absorção e assimilação de nitratos e outros que influenciam a disponibilidade de nutrientes para a absorção e/ou assimilação pela planta (Anjana *et al*, 2009).

Estes factores podem ser diferenciados em factores fisiológicos, factores ambientais e factores agrícolas (Salomez *et al*, 2009; Anjana *et al*, 2009).

### 3.2.1. Factores fisiológicos

O teor de nitratos nas plantas varia entre espécies e cultivares sendo geneticamente determinado (Chiesa, 2003), ou seja, a natureza da informação genética influencia a eficácia da actividade dos transportadores, das enzimas responsáveis pela redução e assimilação dos nitratos e do metabolismo do carbono (Weimin, 1998; Forde, 2000, Shao-ting *et al*, 2007).

A capacidade redutora das folhas de alface varia de acordo com a sua idade (Correia, 2009). De acordo com Marschner (2002), a actividade da nitrato-redutase é máxima quando a folha se encontra completamente expandida, diminuindo após atingir essa fase do desenvolvimento. Desta forma, criam-se condições propícias à acumulação de nitratos nos vacúolos, já que, como anteriormente referido, os nitratos aí armazenados não possuem a capacidade de se moverem no floema (Marschner, 2002; Varennes, 2003).

As características das variedades de alface também parecem ser relevantes na acumulação de nitratos. Nas alfaces que não formam repolho, tendencialmente, as folhas mais velhas apresentam concentrações mais elevadas de nitratos do que as mais novas (Ott *et al*, 2008). No entanto, as alfaces que formam repolho tendem a apresentar teores superiores de nitratos nas folhas mais novas, pois o rápido crescimento do repolho promove a redução da actividade fotossintética, e consequentemente da nitrato-redutase, devido ao ensombramento dessas folhas pelas folhas mais velhas (Burns *et al*, 2002).

### 3.2.2. Factores ambientais

Existem duas situações distintas que necessitam de ser abordadas, os factores que influenciam a absorção de nitratos (Chung *et al*, 2005), e os que afectam a sua assimilação, de forma directa e indirecta.

No que se refere aos factores que influenciam a absorção de nitratos, destacam-se: a qualidade do solo, principalmente a concentração em nitratos (Forde, 2000), e a condutividade eléctrica (Chung *et al*, 2005). Por um lado, a absorção de nitratos é realizada por um sistema de transportadores existentes na membrana plasmática cuja sua actividade é parcialmente induzida pela presença de

nitratos na solução do solo (Forde, 2000). Por outro lado, em solos salinos, devido às funções de contra-íões que os iões nitrato desempenham na osmorregulação, as plantas tendem a acumular nitratos nos seus vacúolos de modo a permitir a absorção de água pelas raízes (Chung *et al*, 2005).

As condições ambientais, como por exemplo a humidade atmosférica, a temperatura, o fotoperíodo e, principalmente, a intensidade luminosa, actuam directamente e indirectamente na acumulação de nitratos. Por um lado, a luz assume um papel fundamental na activação da nitrato-redutase (Maldonado *et al*, 2000), enzima chave no processo de redução dos nitratos. Por outro lado, estes factores influenciam o metabolismo do carbono, afectando a disponibilidade de energia (ATP), o poder redutor (NADPH) e os teores de carbono (Shao-ting *et al*, 2007) essenciais para o processo de assimilação.

De acordo com Anjana *et al* (2009), pode ocorrer a acumulação de nitratos em situações em que exista uma baixa intensidade luminosa associada a um aumento da temperatura, pois a actividade da nitrato-redutase é estimulada pela luminosidade (Maldonado *et al*, 2000).

### 3.2.3. Factores nutricionais

Os factores nutricionais (adubação azotada, fraccionamento da adubação azotada, formas químicas, inibidores de nitrificação, disponibilidade de outros nutrientes, etc.), são considerados determinantes na acumulação de nitratos, principalmente os factores relativos à adubação azotada (Vieira *et al*, 1998; Santamaria, 2006; Salomez *et al*, 2009; Correia, 2009; Anjana *et al*, 2009).

Os teores de nitratos na planta desempenham um papel muito importante em todo o processo da sua assimilação, tanto ao nível da definição da morfologia do sistema radicular da alface (Gorska *et al*, 2008), como ao nível do estímulo da sua absorção (Forde, 2000) e da síntese da nitrato-redutase (Maldonado *et al*, 2000; Mengel *et al*, 2001).

No planeamento da adubação deverá ainda ser contemplado o fornecimento de outros macronutrientes e de micronutrientes (Anjana *et al*, 2009). Estes elementos possuem uma acção importante ao nível da absorção (como por exemplo o potássio), ao nível da redução (como por exemplo: o molibdénio, o fósforo ou o magnésio) e também podem substituir os nitratos nas funções de osmoregulação (como é o caso do cloro) (Anjana *et al*, 2009).

### 3.2.4. Interacção entre factores que favorecem relevantemente a acumulação de nitratos

Dos factores referidos, aqueles que parecem desempenhar um papel mais relevante neste processo são a intensidade luminosa, a temperatura e a adubação azotada (Burns *et al*, 2002; Chiesa, 2003; Santamaria, 2006; Correia, 2009, Anjana *et al*, 2009). Os factores climáticos são mais determinantes

na acumulação de nitratos que as taxas de adubação azotada (Anjana *et al*, 2009), no entanto estas últimas são mais fáceis de controlar (Salomez *et al*, 2009).

É possível identificar, pelo menos, duas situações distintas em que estes factores se conjugam de maneira diferente: a primeira relativa a culturas de Outono-Inverno, onde se verifica uma baixa intensidade luminosa, e a segunda respeitante a culturas de Primavera-Verão, em que existe uma elevada intensidade luminosa.

Nas culturas de Outono-Inverno existe uma menor exigência em azoto comparativamente com as culturas de Primavera-Verão (Burns *et al*, 2002, Anjana *et al*, 2009) sendo que a intensidade luminosa se comporta como um factor limitante da adubação azotada (Chiesa, 2003), pois a falta de luz limita a taxa de activação da nitrato-redutase e consequentemente ocorre diminuição da assimilação dos nitratos absorvidos (Chung *et al*, 2005), observando-se a acumulação do teor de nitratos nas folhas.

Esta situação agrava-se quando a produção ocorre em abrigos (estufas, túneis, etc.) porque este tipo de estruturas, tenham elas coberturas de vidro ou plástico, reduzem a transmissão da radiação solar entre 15 – 20% (Pavlou *et al*, 2007; Almeida & Reis, 2010). Nas estufas de vidro esta situação é mais grave porque a estrutura que suporta a cobertura é mais robusta e promove um ensombramento superior do que as estruturas de abrigos com cobertura de plástico (Almeida & Reis, 2010).

Nas culturas de Primavera-Verão a intensidade luminosa e temperatura características destes períodos são suficientes para que exista energia e activação da nitrato-redutase necessárias para a planta conseguir assimilar os nitratos acumulados nas suas folhas. Nestas épocas, a acumulação de elevados teores de nitratos é mais difícil, a menos que exista uma adubação azotada excessiva (Chiesa, 2003).

De acordo com Weimin (1998) uma das principais causas deste problema reside no facto do agricultor associar a adubação azotada ao aumento da produção e consequentemente de rendimento, promovendo por isso o abuso desta prática.

### 3.2.5. Limites máximos de resíduos de nitratos permitidos nas alfaces

Como será descrito no capítulo seguinte, embora os nitratos sejam constituintes naturais das plantas, quando ingeridos em quantidades elevadas podem promover problemas de saúde (Correia, 2009). Desta forma, sendo que a alface foi classificada como uma planta com capacidade de acumular um teor muito elevado de nitratos ( $> 2500 \text{ mg kg}^{-1}$  material fresco) (Santamaria, 2006), reduzir estas concentrações é considerado por Chiesa (2003) como uma adição de valor qualitativo ao vegetal.

Assim, para prevenir problemas de saúde pública, a Comissão Europeia fixou os limites máximos de resíduos (LMR) para a cultura da alface (quadro 8), sendo a regulamentação mais recente do ano de

2006 (regulamento CE nº 1881/2006). De acordo com Correia (2009) os nitratos aparentemente não representam perigo toxicológico abaixo destes valores.

**Quadro 8 - Limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface.**

		<b>Teores máximos de nitratos (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Alface do tipo <i>"Iceberg"</i>	Alface cultivada em estufa	2500
	Alface cultivada em campo (ar livre)	2000
<b>Colhida de 1 de Outubro a 31 de Março</b>		
Outros tipos de alface fresca	Alface cultivada em estufa	4500
	Alface cultivada em campo (ar livre)	4000
	<b>Colhida de 1 Abril a 30 Setembro</b>	
	Alface cultivada em estufa	3500
	Alface cultivada em campo (ar livre)	2500

Fonte: Regulamento (CE) nº 1881/2006



#### 4. CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE HUMANA DA INGESTÃO DE NITRATOS

De acordo com Hord *et al* (2009), os nitratos não possuem actividade biológica, ao contrário dos produtos da sua redução (nitritos, óxidos nitrosos e outros produtos metabólicos). Para além disso, a toxicidade dos nitratos é muito baixa para o ser humano (Horta, 1998) ao contrário dos nitritos (Santamaria, 2006).

Assim, para uma melhor compreensão da problemática, torna-se relevante: (i) clarificar o contributo da alface como fonte de nitratos e nitritos na dieta humana; (ii) saber quais as recomendações máximas de ingestão diária destas formas de azoto; (iii) compreender o metabolismo dos nitratos e nitritos no corpo humano; e por fim (iv) identificar os tipos de efeitos toxicológicos e benéficos da sua ingestão.

##### 4.1. Alface como fonte de exposição de nitratos e nitritos na dieta humana

Os vegetais, nomeadamente as culturas hortícolas, são considerados a principal fonte de nitratos da dieta humana, representando 80 a 95% do total de nitratos ingeridos (Correia *et al*, 2010). O quadro 9 ilustra esta situação.

**Quadro 9 - Fontes e estimativa de ingestão de nitratos ao nível global.**

Região	Fontes de nitratos na dieta humana ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )			
	Vegetais	Água	Cereais	Frutos
Médio Oriente	650	200	100	50
Oriente	450	300	150	100
África	300	400	150	100
América Latina	650	150	50	100
Europa	900	50	<50	50

(Fonte: Santamaria, 2006)

No que aos nitritos diz respeito, salienta-se que embora os teores presentes nas alfaces sejam reduzidos, podem aumentar significativamente devido à redução dos nitratos acumulados nas suas folhas (Correia, 2009; Chan, 2011). Este fenómeno pode ocorrer na consequência da redução endógena dos nitratos pela nitrato-redutase ou pela contaminação com bactérias (Chan, 2011),

provenientes por exemplo das águas de lavagem (L'Hirondel *et al*, 2002), que podem proliferar significativamente à temperatura ambiente no período pós-colheita (Correia, 2009).

**Quadro 10 - Classificação dos vegetais de acordo com o seu teor em nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  material fresco).**

<b>Muito baixo</b> ( $< 200$ )		<b>Baixo</b> (200-500)	<b>Médio</b> (500-1000)	<b>Elevado</b> (1000-2500)	<b>Muito elevado</b> ( $> 2500$ )
Abóbora	Ervilhas	Abóbora-	Couve	Aipo vermelho	Agrião
Alcachofra	Espargos	menina	Couve Sabóia	Alho francês	Aipo
Alho	Fava	Brócolos	Endro	Couve chinesa	Alface
Batata	Feijão-	Cenoura	Nabo	Rábano	Alface-de-
Batata-	verde	Couve-Flor		Chicória	cordeiro
doce	Melancia	Pepino		Funcho	Acelga
Beringela	Melão			Salsa	Cerefólio
Cebola	Pimentos				Espinafre
Cogumelos	Tomate				Rabanete
Couves de					Rúcula
Bruxelas					

(Fonte: Correia, 2009)

#### 4.2. Consumo diário aceitável de nitratos e nitritos (“acceptable daily intake”)

O conceito de ADI (“acceptable daily intake”) foi criado pelo Joint Expert Committee of the Food and Agriculture (JECFA) Organization of the United Nations/ World Health Organization (WHO) e tem como pressuposto oferecer um elevado grau de protecção do consumidor contra a exposição indesejada a substâncias tóxicas (Boink & Speijers, 2001). Este grupo de peritos definiu que o ADI para o ião nitrato é de  $0\text{--}3,7 \text{ mg dia kg}^{-1}$  de peso corporal e para o ião nitrito de  $0\text{--}0,07 \text{ mg dia kg}^{-1}$  de peso corporal (Hambridge, 2003).

Por outro lado, a EPA (USA Environmental Protection Agency) sugere doses de referência (RfD) máxima de iões nitrato e nitrito superiores, sendo a RfD de  $\text{NO}_3^-$  de  $7,0 \text{ mg dia kg}^{-1}$  de peso corporal e a RfD de  $\text{NO}_2^-$   $0,33 \text{ mg dia kg}^{-1}$  de peso corporal (Santamaria, 2006).

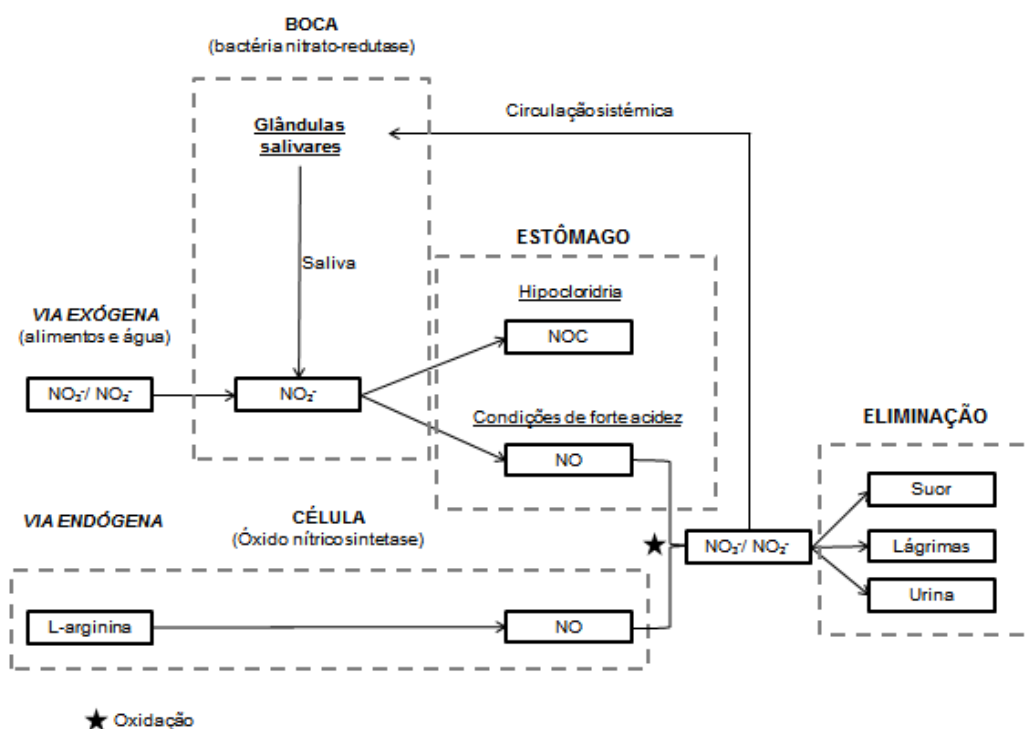
É importante salientar que todos os valores acima referidos abrangem todas as fontes de nitratos e nitritos, não apenas a fonte “alface”.

De acordo com Boink *et al* (2001), facilmente se ultrapassam os valores impostos pela ADI. Santamaria (2006) ilustra a facilidade com que estes limites podem ser ultrapassados, referindo que

um indivíduo de 60 kg pode ultrapassar em 13% o ADI se ingerir 100g de um vegetal que possua uma concentração de nitratos na ordem dos 2500 mg kg<sup>-1</sup>. Neste exemplo, esse indivíduo ingere de 250 mg de nitratos quando o máximo que deveria ingerir seria 222 mg de NO<sub>3</sub>.

### 4.3. Metabolismo dos nitratos no corpo humano

O Homem possui duas vias de obter nitratos e nitritos (figura 5): a via endógena e a via exógena.



**Figura 5 - Metabolismo dos nitratos e nitritos no corpo humano (adaptado de Heitor, 2000; Shao-ting et al, 2007; Hord et al, 2009).**

Na via endógena, os nitratos são obtidos pela oxidação do óxido nítrico sintetizado nas células a partir do aminoácido L-arginina e na via exógena os nitratos são obtidos a partir da ingestão de alimentos e água (Heitor, 2000).

De acordo com Walker (1999), 25% dos nitratos presentes na cavidade oral são segregados pelas glândulas salivares e apenas 5% do total de nitratos aqui presentes são reduzidos a nitritos. Esta redução é realizada por um conjunto de bactérias nitrato-redutase que se encontram localizadas na superfície da língua (Li *et al*, 1999). No entanto é possível que a redução ocorra também no tracto gastrointestinal (Boink *et al*, 2001).

Os nitritos, ingeridos ou previamente reduzidos, são acidificados e convertidos em compostos azotados, principalmente óxido nítrico (NO), em condições de forte acidez, e compostos do tipo N-nitroso (NOC), em condições de hipocloridria (Shao-ting *et al*, 2007). Esta acidificação ocorre com maior relevância no estômago. Os NOC formam-se quando os nitritos reagem com amidas e aminas (Correia, 2009) para formarem nitrosamidas e nitrosaminas respectivamente (Shao-ting *et al*, 2007).

Os nitratos e nitritos ingeridos pelo Homem são absorvidos pelo intestino delgado (Ellis *et al*, 1998) sendo que 25% dos nitratos derivados da alimentação e da água voltam a entrar em circulação entre a saliva e o tracto gastrointestinal (Shao-ting *et al*, 2007). Dos nitratos ingeridos oralmente, 65-70% são excretados pela urina (Walker, 1999), existindo também outras formas de excreção (lágrimas e suor).

#### **4.4. Possíveis efeitos na saúde humana da ingestão de nitratos e nitritos**

Actualmente a comunidade científica encontra-se numa indefinição quanto aos reais efeitos dos nitratos na saúde humana (Shao-ting *et al*, 2007; Powlson *et al*, 2008), pois apesar de existirem estudos que ligam uma dieta rica em nitratos com a incidência de metahemoglobinémia infantil e o risco de neoplasias em adultos, a veracidade desses estudos tem sido colocada em causa devido a falta de evidência científica (Horta, 1998, L'Hirondel *et al*, 2002; Powlson *et al*, 2008). Por outro lado, existem estudos fisiológicos que atribuem um efeito benéfico à ingestão de nitratos (Golden *et al*, 1999; Shao-ting *et al*, 2007; Powlson *et al*, 2008).

Perante esta indefinição, Boink *et al* (2001) e Santamaria (2006) consideram que se deve evitar a ingestão continuada de nitratos em quantidades superiores às recomendadas pelo ADI, pois não se conhece concretamente as consequências de uma exposição prolongada.

Salienta-se, como foi citado anteriormente, que os nitratos não apresentam actividade biológica mas sim os compostos da sua redução, principalmente o  $\text{NO}_2^-$ , NO e os NOC. É ainda importante relembrar que, estes compostos no organismo humano apresentam actividade promovendo a existência de efeitos toxicológicos ou benéficos na saúde humana.

##### **4.4.1. Efeitos toxicológicos da ingestão de nitratos na saúde humana**

###### ***Metahemoglobinémia infantil***

A metahemoglobina (MetHb) é uma forma de hemoglobina, potencialmente letal (Golden *et al*, 1999; Heitor, 2000; Boink *et al*, 2001; Santamaria, 2006; Shao-ting *et al*, 2007) em que a disponibilidade de oxigénio está comprometida, observando-se por isso a cianose dos tecidos.

Este problema pode ocorrer preferencialmente em recém-nascidos com menos de três meses, pois neste período existe uma menor actividade da enzima que converte a MetHb em hemoglobina (Hb), por sua vez o pH gástrico é mais elevado favorecendo a proliferação de bactérias nitrato-redutase e por fim porque existem teores mais elevados de hemoglobina oxidada (oxiHb) no plasma o que permite a uma maior formação de MetHb (Santamaria, 2006; Chan, 2011). Embora possa também ocorrer noutras faixas etárias, em circunstâncias normais, o risco diminui a partir dessa idade sendo praticamente nulo no estado adulto.

A formação da MetHb ocorre quando os nitritos presentes no plasma, reduzidos no estômago e intestino delgado, reagem com a Hb (Heitor, 2000; Shao-ting *et al*, 2007), de acordo com a seguinte reacção:



#### *Efeitos cancerígenos*

Pensa-se que a ingestão de nitratos promove o aumento da incidência de neoplasias gástricas (Shao-ting *et al*, 2007) e mais recentemente na tiróide (Kilfoy *et al*, 2011) em indivíduos adultos. Os efeitos cancerígenos são associados principalmente à formação de NOC's no estômago (Boink *et al*, 2001), no entanto, Kilfoy *et al* (2011) sugerem que o próprio ião nitrato poderá interferir na absorção de iodo pela tiróide induzindo indirectamente o cancro da tiróide. Salienta-se que os autores consideram que os resultados obtidos até à data necessitam de ser validados e confirmados com novos estudos.

#### *Outros efeitos*

Ao longo do tempo surgiram estudos que sugerem uma série de possíveis complicações associadas à ingestão de nitratos, que no entanto de acordo com Horta (1998) e L'Hirondel *et al* (2002) são infundadas. As referidas complicações são: aumento do risco de mortalidade fetal, genotoxicidade, malformações congénitas, promoção do aumento de volume na glândula tiróide e aparecimento precoce de hipertensão arterial.

#### 4.4.2. Efeitos benéficos da ingestão de nitratos na saúde humana

Os nitratos que circulam repetitivamente no sangue possuem funções vitais no metabolismo humano por meio de um dos seus metabolitos, o óxido nítrico (NO) (Shao-ting *et al*, 2007). O NO é um vasodilatador com funções ao nível da regulação do fluxo sanguíneo e transmissão de informação através dos neurónios, sendo também ao mesmo tempo um potencial protector do sistema cardiovascular (Shao-ting *et al*, 2007; Ralt, 2009).

Por outro lado os nitratos ingeridos e os seus metabolitos também desempenham um papel fisiológico importante na eliminação de patogénicos ingeridos, ou seja protegem o sistema gastrointestinal da acção destes agentes (Shao-ting *et al*, 2007).

A deficiência prolongada de NO está correlacionada com varias doenças crónicas tais como: obesidade, diabetes, hipertensão, hipertensão pulmonar e osteoporose (Ralt, 2009).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Com vista a atingir os objectivos propostos para este trabalho foram realizados cinco ensaios:

- Quatro ensaios de campo, onde se avaliou num contexto prático: (i) o efeito da adubação foliar com molibdénio em complemento da sua aplicação em fertirrega na acumulação de nitratos na parte aérea das alfaces, (ii) a acumulação de nitratos em diferentes variedades/linhas de alface e (iii) a evolução das características dos solos.
- Um ensaio em vasos, onde se estudou em condições controladas: (i) o efeito da adubação foliar com molibdénio em complemento da sua aplicação em fertirrega na acumulação de nitratos na parte aérea das alfaces (ii) e a influência do corte de adubação.

Em todos os ensaios foram utilizadas plantas de viveiro comercial.

### 5.1. Ensaios de campo

#### 5.1.1. Localização do ensaio

Os ensaios de campo foram realizados numa empresa do tipo familiar, sediada na povoação da Tourinha, Freguesia da Azueira do concelho de Mafra (figura 6).

Os ensaios foram divididos em dois subgrupos, de acordo com a época de produção. Assim, dois ensaios foram efectuados ao ar livre (figura 6 – A; 38°59'28.86"N 9°14'43.96"W), o primeiro decorreu entre 4 de Setembro de 2010 e 8 de Outubro de 2010 (35 dias) e o segundo entre 9 de Abril de 2011 e 19 de Maio de 2011 (41 dias). Os outros dois ensaios foram realizados em estufa (figura 6 – B; 38°59'48.76"N 9°15'23.40"W), o primeiro entre 23 de Outubro de 2010 a 13 de Dezembro de 2010 (52 dias) e o segundo de 23 de Dezembro de 2010 a 16 de Fevereiro de 2011 (56 dias).



**Figura 6 - Localização dos ensaios de campo (A- Localização dos ensaios campo ao ar livre; B- Localização dos ensaios de campo em estufa).**

### 5.1.2. Delineamento experimental

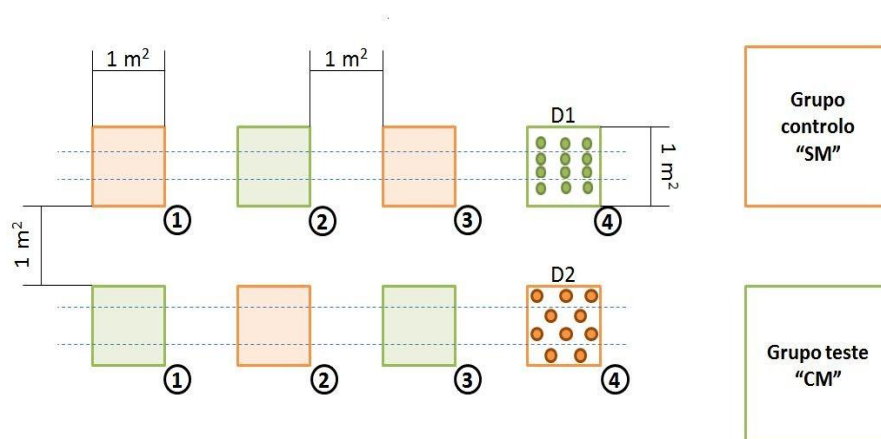
#### *Efeitos da adubação foliar com molibdénio em complemento de uma adubação completa por fertirrega na redução da acumulação de nitratos*

Nestes ensaios foram utilizadas plantas de alface da var. *capitata*, designadas por alface frisada. As linhas desta alface diferiram de acordo com o tipo de ensaio de campo, sendo que nos ensaios de ar livre utilizaram-se alfaces da linha 'Emocion RZ' e nos ensaios de estufa alfaces da linha 'Gurdie RZ'. Optou-se por estas linhas porque foram as utilizadas na exploração durante os períodos de ensaio.

Nestes ensaios de campo foram testadas apenas duas modalidades: fertilização completa sem aplicação foliar de molibdénio (SM – grupo controlo) e fertilização completa com aplicação foliar de molibdénio (CM – grupo teste).

Todos os ensaios obedeceram a um delineamento idêntico, existindo quatro talhões de 1 m<sup>2</sup> por modalidade, separados entre si por igual distância (figura 7). Cada talhão era composto por doze alfaces, no caso dos ensaios realizados ao ar livre, ou dez alfaces, nos ensaios efectuados em estufa. Destes oito talhões, quatro eram destinados ao grupo controlo e os restantes quatro corresponderam ao grupo de teste.

Para minimizar os efeitos das condições ambientais optou-se por um lado por dispor os talhões do grupo controlo de forma a alternar com os do grupo teste e por outro lado montaram-se ambos os ensaios de cada época de produção em posições idênticas. É ainda de referir que os ensaios estavam inseridos em sectores de produção, possibilitando assim a percepção dos efeitos da adubação com molibdénio num contexto prático.



**Figura 7 - Esquematização do posicionamento e distribuição dos talhões de ensaio.**

(D1 – Distribuição das alfaces nos talhões de ensaios de campo realizados ao ar livre; D2 – Distribuição das alfaces nos talhões de ensaio de campo realizados em estufa).



### Estudo da influência da variedade e/ou linha de alface na acumulação de nitratos

Estes ensaios ocorreram simultaneamente com os ensaios de ar livre e consistiu apenas na colheita aleatória de duas alfaces de cada variedade e/ou linha cultivada na exploração e com a mesma idade (quadro 11), para posterior análise ao teor de nitratos presentes nas suas folhas. Esta averiguação foi realizada apenas nestes ensaios por não haver produção destas linhas nas campanhas em estufa na exploração. Em anexo é possível encontrar-se fotografias destas linhas de alface (anexo 1).

**Quadro 11 - Variedades utilizadas no estudo da influência da variedade na acumulação de nitratos.**

Nome	Variedade	Nome	Variedade
Alface Frisada (linha Emocion RZ)	<i>capitata</i>	Alface Folha de Carvalho Verde (linha Kitare RZ)	<i>acephala</i>
Alface Lisa (linha Forlina RZ)	<i>capitata</i>	Alface Folha de Carvalho Roxa (linha Ribai RZ)	<i>acephala</i>
Alface Roxa (linha Teide RZ)	<i>capitata</i>		

#### 5.1.3. Caracterização dos solos

Segundo IUSS Working Group WRB (2006), os solos onde foram montados os ensaios são classificados como: Regossolo Árico (ensaios realizados ao ar livre) e Calcissolo Leptico (ensaios realizados em estufa). As propriedades da parte arável destes solos encontram-se descritas no quadro 12.

**Quadro 12 - Propriedades iniciais dos solos onde foram realizados os ensaios de campo.**

Parâmetro	Regossolo Árico (ensaios em ar livre)	Calcissolo Leptico* (ensaios em estufa)
Condutividade ( $\text{mScm}^{-1}$ )	0,354	0,73
pH( $\text{H}_2\text{O}$ )	7,2	8,13
pH(KCl)	6,79	7,33
M. org. ( $\text{g kg}^{-1}$ )	24,6	20,5
$\text{P}_2\text{O}_5$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	462,6	636,00
$\text{K}_2\text{O}$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	241	1220
$\text{N-NH}_4$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,8	4,59
$\text{N-NO}_3$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	58,76	98,56
Microelementos		
Fe	236,5	87,80
Cu	30,9	7,10
Zn	5,31	7,61
Mn	192	141,90
Ca	13,9	21,38
Bases de Troca		
Mg	1,69	3,24
$\text{Na}$	0,54	0,77
$\text{K}$	0,34	2,45

\* A colheita das amostras de solo foi realizada após a aplicação de estrume de ovinos.

#### 5.1.4. Fertilização e rega

A adubação foi efectuada através da rega correspondendo à que normalmente é praticada na exploração. No quadro 13 encontra-se disponibilizada a informação relativa à composição da solução nutritiva e dos adubos utilizados na exploração.

Em todos os ensaios foram efectuadas duas adubações foliares, nos talhões “CM”, com uma solução aquosa com 300 mg L<sup>-1</sup> de Mo sob a forma de molibdato de sódio (Molibdan). Em todas as adubações foi aplicado 1 litro de solução no conjunto dos quatro talhões. A primeira adubação foliar ocorreu no início da fase de crescimento vegetativo e a segunda 15 dias após a primeira aplicação.

**Quadro 13 - Composição da solução nutritiva e adubos utilizados na exploração.**

	<b>Ensaio de campo em estufa</b>	<b>Ensaio de campo ao ar livre</b>
	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Cálcio (Ca)	116,98	162,72
Magnésio (Mg)	38,96	49,34
Potássio (K)	61,89	14,86
Fósforo (P)	6,81	5,27
N-NH <sub>4</sub>	26,29	11,76
N-NO <sub>3</sub>	81,26	121,10
Ferro (EDTA Fe)	1,16	0,20
Boro (Bo)	0,10	0,02
Cobre (Cu)	0,21	0,05
Manganês (Mn)	0,69	0,20
Zinco (Zn)	0,24	0,06
Molibdénio (Mo)	0,05	0,01

Os adubos utilizados para a elaboração desta solução nutritiva foram os seguintes: Sulfato de Potássio (51% K<sub>2</sub>O); Sulfato de Magnésio (16% MgO); Nitrato de Cálcio (14,4% Azoto nítrico, 26,5% CaO); Nitrato de Amónio (17,3% Azoto nítrico, 17,2% Azoto Amoniacal); Ácido Fosfórico a 72% (31% P); e Adubo só com micronutrientes e com a seguinte composição: Ferro (7,5% Fe); Boro (0,65% B); Cobre (0,28% Cu); Manganês (3,5% Mn); Molibdénio (0,3% Mo); Zinco (0,7% Zn).

Em anexo encontram-se disponibilizadas as análises realizadas às águas de rega utilizadas em cada tipo ensaio de campo (anexo 2).

Na exploração é utilizado um sistema de microrrega automatizado com emissores de gota-a-gota de baixo caudal. É efectuado um número variável de regas por dia de forma a compensar as perdas de

água por evapotranspiração, sendo que cada dotação de rega é de aproximadamente 3 mm.

#### 5.1.5. Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos considerados neste estudo foram a temperatura e a radiação, obtidos numa estação meteorológica automática localizada na povoação do Carrascal (38°99'78.58"N 9°27'68.81"W) a uma altitude de 66 metros.

#### 5.1.6. Amostragem

O processo de amostragem foi realizado aleatoriamente, sendo colhidas duas alfaces aleatoriamente de cada talhão obtendo-se assim um total de oito amostras relativas ao grupo controlo e outras tantas relativas ao grupo teste. Cada alface foi pesada, para definir o peso fresco, e cortada ao meio: (i) metade foi utilizada para a avaliação do teor de nitratos acumulados na parte aérea; (ii) a outra metade foi pesada e levada a secar em estufa a uma temperatura de 50 °C durante um período de 48 a 72 horas, sendo posteriormente novamente pesada, para determinar o peso seco, e moída para se proceder às análises foliares.

Foram ainda colhidas oito amostras de solo, uma por cada talhão, para posterior análise.

### 5.2. Ensaio em vasos

#### 5.2.1. Localização do ensaio

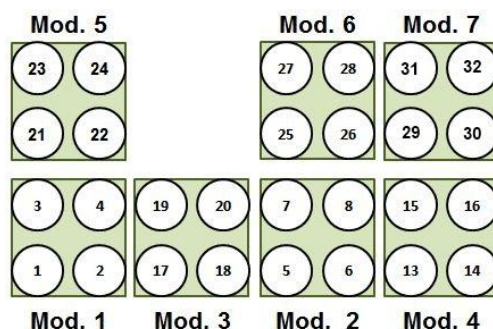
O ensaio em vasos decorreu durante 41 dias, entre 13 de Abril e 24 de Maio de 2011 na estufa do Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Instituto Superior de Agronomia (38°42'28.66"N 9°11'6.92"W).

#### 5.2.2. Delineamento experimental

No ensaio utilizaram-se 28 vasos, distribuídos por 7 modalidades (quadro 14) com 4 repetições (figura 8) cada.

**Quadro 14 - Modalidades estudadas no ensaio no horto.**

MOD.	DESCRIÇÃO [nº de vaso]
1	Adubação sem Mo [1,2,3,4]
2	Adubação com Mo (apenas na água de rega) [5,6,7,8]
3	Adubação com Mo (apenas na parte aérea) [17,18,19,20]
4	Adubação com Mo (água de rega + parte aérea) [13,14,15,16]
5	Modalidade 1 com corte de adubação 3 dias antes da colheita [21,22,23,24]
6	Modalidade 4 com corte de adubação 1 semana antes da colheita [25,26,27,28]
7	Modalidade 4 com corte de adubação 3 dias antes da colheita [29,30,31,32]



**Figura 8 - Esquema da distribuição das modalidades do ensaio de vasos.**

Para reduzir eventuais diferenças ao nível da intensidade luminosa e temperatura nas diversas modalidades procedeu-se regularmente à rotação dos vasos e também à alternância da posição do ensaio, sendo que durante o dia se colocou o carro com o ensaio fora da estufa recolhendo-o durante a noite, à excepção dos dias em que as condições climáticas não permitiram a adopção deste procedimento.

### 5.2.3. Caracterização do solo

Cada um dos 28 vasos utilizados continha 4.8 kg de solo previamente crivado a 5 mm, cujas características se encontram descritas no quadro 15. Este solo foi recolhido na mesma exploração onde foram realizados os ensaios de campo e de acordo com IUSS Working Group WRB (2006) é classificado como sendo um Calcissolo Háplico.

**Quadro 15 - Características do solo utilizado no ensaio em vasos.**

Parâmetro	Solo	Parâmetro	Solo
Condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	0,41	Fe	95,90
pH( $\text{H}_2\text{O}$ )	7,39	Cu	7,30
pH(KCl)	7,3	Zn	9,41
M. org. ( $\text{g kg}^{-1}$ )	10,6	Mn	126,50
$\text{P}_2\text{O}_5$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	527,2	Ca	21,71
$\text{K}_2\text{O}$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	2980	Mg	3,46
$\text{N-NH}_4$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,04	Na	0,93
$\text{N-NO}_3$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	5,91	K	0,15

#### 5.2.4. Fertilizações e rega

A fertilização de cada vaso iniciou-se 10 dias após a transplantação. Após essa fase procedeu-se a uma adubação por cada rega realizada, sendo a quantidade de adubo aplicada proporcional à rega efectuada (5510 ml vaso<sup>-1</sup>). As composições das soluções nutritivas encontram-se disponibilizadas no quadro 16.

Para além desta adubação foram ainda realizadas duas adubações foliares com molibdénio, em todas as modalidades excepto na modalidade 1 e 2. Tal como nos ensaios de campo, foram realizadas duas adubações foliares com 300 mg L<sup>-1</sup> de Mo sob a forma de molibdato de sódio (Molibdan). A primeira adubação foliar ocorreu no início da fase de crescimento vegetativo e a segunda 15 dias após a primeira aplicação.

**Quadro 16 - Composição das duas soluções nutritivas utilizadas.**

	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	
	Solução nutritiva 1 – sem molibdénio	Solução nutritiva 2 – com molibdénio
Cálcio (Ca)	116,98	
Magnésio (Mg)	38,98	
Potássio (K)	61,89	
Fósforo (P)	7,00	
N-NH <sub>4</sub>	9,30	
N-NO <sub>3</sub>	98,30	
Ferro (EDTA Fe)	1,99	
Boro (Bo)	0,17	
Cobre (Cu)	0,07	
Manganês (Mn)	0,93	
Zinco (Zn)	0,19	
Molibdénio (Mo)	0	0,08

Os adubos utilizados em ambas as soluções nutritivas foram os seguintes:

- Sulfato de potássio (51% K<sub>2</sub>O);
- Sulfato de Magnésio (16% MgO);
- Nitrato de Cálcio (14,4% Azoto nítrico & 26,5% CaO);
- Nitrato de Amónio (17,3% Azoto nítrico & 17,2% Azoto Amoniacal);
- Ácido Fosfórico a 72%;
- Micronutrientes:
  - Ferro – EDTA Fe (15,21% Fe);

- Ácido Bórico –  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (17,48% B);
- Sulfato de Cobre Pentahidratado –  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (25,44% Cu);
- Sulfato de Manganês Hidratado –  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  (32,50% Mn);
- Molibdato de Sódio (39,65% Mo);
- Sulfato de Zinco Heptahidratado –  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (22,05% Zn).

Durante o ensaio, o solo foi mantido, através da diferença de peso médio de três vasos, com um teor de humidade de aproximadamente 60% da capacidade máxima de retenção de água.

#### 5.2.5. Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos considerados neste estudo foram a temperatura e a radiação. Estes dados foram recolhidos no boletim Meteorológico da Tapada da Ajuda com a estação meteorológica localizada na Tapada da Ajuda (38°42'N 9°11'W) a uma altitude de 60 metros.

#### 5.2.6. Amostragem

Todas as alfices de cada modalidade foram colhidas no mesmo período e para cada uma foi realizada uma análise ao material vegetal onde se avaliou os teores de nutrientes presentes nas folhas de alface e a percentagem de matéria seca. De cada alface foram ainda colhidas três amostras de folhas, compostas por fragmentos das folhas correspondentes ao quarto e quinto par de folhas mais novas, e duas amostras de raízes. Estas amostras destinaram-se ao posterior doseamento de proteínas e avaliação *in vitro* da actividade da enzima nitrato-redutase tanto ao nível da folha e como da raiz.

### 5.3. Metodologia

#### 5.3.1. Análise de material vegetal e solo

Salienta-se que todos os métodos e técnicas analíticas adoptadas foram as que são habitualmente utilizadas nos diversos laboratórios afectos aos Centros de Investigação (FCT) de Instituto Superior de Agronomia, e encontram-se resumidos no quadro 17.

##### *Análise do material vegetal*

Nesta análise foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de azoto nítrico e de azoto orgânico e amoniacal, fósforo, potássio, cálcio, sódio, cobre, ferro, zinco, manganês, doseamento de proteínas totais e a actividade da enzima nitrato-redutase.

## Análise do solo

Nestas análises foram avaliados: os parâmetros físico-químicos (pH e condutividade eléctrica) e os parâmetros químicos (matéria orgânica, fósforo e potássio extraíveis, microelementos – Zn, Mn, Fe, Cu –, bases de troca – Ca, Mg, Na, K – e azoto mineral).

**Quadro 17 - Métodos de análise utilizados no presente estudo.**

Parâmetro	Método utilizado	Descrição do método
<b>ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL</b>		
Azoto na forma nítrica	Eléctrodo selectivo dos nitratos	Vesely <i>et al</i> (1978)
Azoto orgânico e amoniacal	Método de Kjeldahl	Horneck & Miller (1998)
P, K, Ca, Na, Cu, Fe, Zn, Mn	Extracção por via seca	Marti & Munõz (1957)
P	Espectrofotometria de absorção molecular – Método do vanadomolibdato de amónio	Koenig & Johnson (1942)
K, Ca, Na, Cu, Fe, Zn, Mn	Espectrofotometria de absorção atómica	
Doseamento de proteínas	Espectrofotometria de absorção molecular (595 nm) – Anexo 3	Bradford (1976)
Actividade da enzima nitrato-redutase	Espectrofotometria de absorção molecular (540 nm) – Anexo 3	Kaiser & Lewis (1984)
<b>ANÁLISE DE SOLO</b>		
pH (H <sub>2</sub> O)	Suspensão solo:água 1:5 (v/v)	Póvoas & Barral (1992)
pH (KCl)	Suspensão solo:KCl 1:5 (v/v)	
Condutividade eléctrica	Suspensão solo:água 1:2 (v/v)	
Matéria Orgânica	Combustão seca em analisador elementar	
Fósforo e Potássio extraíveis	Método de Egner-Riehm: <ul style="list-style-type: none"> <li>Quantificação do P por espectrofotometria de absorção molecular;</li> <li>Quantificação do K por fotometria de emissão de chama</li> </ul>	Egner <i>et al</i> (1960)
Azoto mineral (nitrato e amoniacal)	Espectrofotometria de absorção molecular	Mulvaney (1996)
Microelementos	Quantificação por espectrofotometria de absorção atómica após extracção com solução de ácido acético 0,5 M	Lakanen & Ervio (1971)
Bases de Troca	Método do acetato de amónio 1 M a pH 7	Schollenberger & Simon (1945)

### 5.3.2. Tratamento estatístico

Para a análise estatística dos resultados obtidos recorreu-se ao programa de computador SPSS versão 17.

A selecção dos testes a aplicar no tratamento estatístico dependeu da existência ou não de normalidade na distribuição da amostra, da existência ou não de homogeneidade de variâncias e do número de amostras que se pretendeu comparar. No quadro 18 encontra-se disponibilizada uma breve síntese relativa aos testes utilizados, de acordo com Maroco (2003).

A significância foi estabelecida para valores de probabilidade inferiores a 5% ( $p=0,05$ ), considerando-os como significativos.

**Quadro 18 - Testes e critérios utilizados na sua selecção**

Objectivo	Testes utilizados
Testes utilizados para averiguar a existência ou não de distribuição normal das amostras ( <i>distribuição normal quando sig. &gt; 0,05</i> )	Teste de Kolmogorov – Smirnov Teste de Shapiro – Wilk
Testes utilizados para averiguar a existência ou não de homogeneidade de variâncias ( <i>homogeneidade de variâncias quando sig. &gt; 0,05</i> )	Teste de Levéne
<b>Testes não paramétricos para comparação de amostras independentes</b> (utilizados quando não se verificou normalidade na distribuição da amostra e/ou as amostras possuíam dimensões diferentes e não tinham variâncias homogéneas)	
Comparação de duas amostras independentes	Teste Mann – Whitney
Comparação de mais de duas amostras independentes	Teste Kruskal – Wallis
Comparações múltiplas de mais de duas amostras independentes	Teste Mann – Whitney
<b>Testes paramétricos de comparação de amostras independentes</b> (utilizados quando existia normalidade na distribuição da amostra e as amostras possuíam a mesma dimensão)	
Comparação de duas amostras independentes	Teste T de student
Comparação de mais de duas amostras independentes	Teste ANOVA
Comparações múltiplas de médias em amostras de igual dimensão	Teste de Tukey
Comparações múltiplas de médias em amostras de diferentes dimensões	Teste de Scheffe

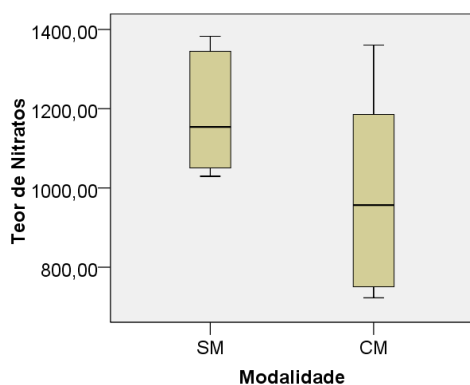


## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

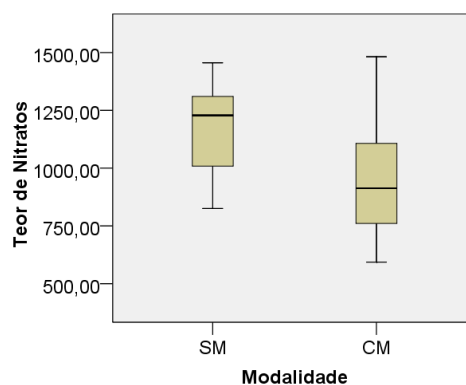
### 6.1. Resultados dos ensaios de campo

#### 6.1.1. Efeitos da adubação foliar com molibdênio em complemento de uma adubação completa por fertirrega na redução da acumulação de nitratos

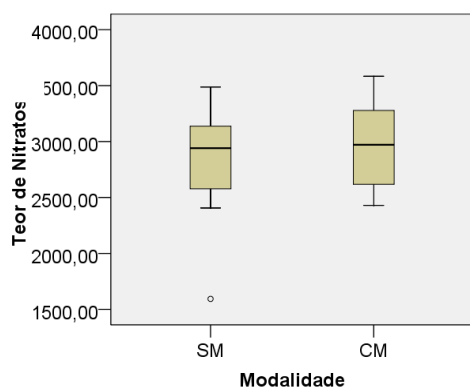
Antes de dar início a esta análise de resultados importa salientar que de acordo com análises estatísticas efectuadas o solo não interferiu significativamente nos resultados obtidos. Em anexo encontra-se disponibilizado todo o tratamento de dados que fundamenta esta afirmação (anexo 4) e nos gráficos seguintes (gráficos 1, 2, 3 e 4) os resultados obtidos em cada ensaio. No anexo 5 encontram-se ainda disponibilizados todos os resultados e tratamento estatístico inerentes a este subcapítulo.



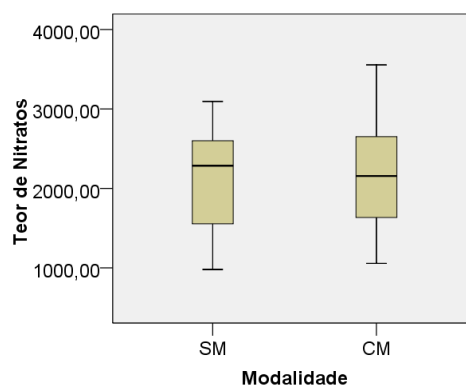
**Gráfico 1 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) das duas modalidades no 1º ensaio de campo em ar livre.**



**Gráfico 2 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) das duas modalidades no 2º ensaio de campo em ar livre.**



**Gráfico 3 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) das duas modalidades no 1º ensaio de campo em estufa.**



**Gráfico 4 - Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) das duas modalidades no 2º ensaio de campo em estufa.**

As análises aos teores de nitratos acumulados nas folhas de alface mostraram, em todos os ensaios de campo, que não existem diferenças significativas entre as duas modalidades estudadas:

fertilização completa sem aplicação foliar de molibdénio (SM) e fertilização completa com aplicação foliar de molibdénio (CM). Ainda assim, interessa salientar que nos ensaios de campo realizados ao ar livre esteve-se muito perto de atingir diferenças significativas entre as modalidades dadas as tendências observadas, o mesmo não acontecendo nos ensaios realizados em estufa (quadro 19).

**Quadro 19 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg de NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) existente em cada modalidade de cada ensaio de campo, resultados do tratamento estatístico através do teste paramétrico T-student.**

	Linha	Modalidade	Teor médio de nitratos acumulados na parte aérea ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde)	
<b>1º Ensaio de campo ao ar livre</b>	'Emocion Rz'	SM	1188,77	a
		CM	983,63	a
<b>2º Ensaio de campo ao ar livre</b>	'Emocion Rz'	SM	1171,97	a
		CM	954,60	a
<b>1º Ensaio de campo em estufa</b>	'Gurdie Rz'	SM	2840,38	a
		CM	2968,87	a
<b>2º Ensaio de campo em estufa</b>	'Gurdie Rz'	SM	2119,24	a
		CM	2186,83	a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas de cada um dos ensaios indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$

Nenhuma das alfaces que compunham as amostras de cada modalidade ultrapassou os limites máximos de resíduos de nitratos impostos pela comissão europeia (quadro 20).

**Quadro 20 - Datas de colheita das amostras nos diversos ensaios, teores máximos de nitratos acumulados nas amostras e limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface de acordo com a data de colheita.**

	Linha	Data de colheita	Mod.	Teor máximo de nitratos acumulados na parte aérea ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde)	
				Obtido	Permitido (LMR)
1º Ensaio de campo em ar livre	'Emocion Rz'	8-10-2010	SM	1382,64	4000
			CM	1360,45	
2º Ensaio de campo em ar livre	'Emocion Rz'	19-05-2011	SM	1455,35	2500
			CM	1481,96	
1º Ensaio de campo em estufa	'Gurdie Rz'	13-12-2010	SM	3486,45	4500
			CM	3583,65	
2º Ensaio de campo em estufa	'Gurdie Rz'	16-02-2011	SM	3094,10	
			CM	3554,81	

Tal como se pode constatar, os teores de nitratos acumulados nos vacúolos das folhas de alface foram superiores nos ensaios em estufa. Este resultado era esperado pois, conforme foi demonstrado por Byrne *et al* (2004), no mesmo ambiente, as culturas de alface efectuadas no inverno geralmente possuem níveis de nitratos acumulados superiores às culturas de verão. Isto deve-se aos factores climáticos, principalmente à reduzida radiação solar observada nos períodos em que se efectuaram os ensaios em estufa (quadro 21). Nestas condições tanto a assimilação dos nitratos (Chung *et al*, 2005) como a assimilação do carbono (Varennnes, 2003) encontram-se limitadas. Salienta-se que nestes ensaios a radiação solar foi ainda mais reduzida devido ao plástico utilizado como cobertura do abrigo que reduz a radiação em 15-20% (Pavlou *et al*, 2007; Almeida *et al*, 2010). Assim, menos luz implica uma redução da actividade da enzima nitrato-redutase e consequente acumulação de nitratos. O facto da linha de alface utilizada em estufa ser diferente da utilizada ao ar livre também pode ter contribuído para este fenómeno.

**Quadro 21 - Dados meteorológicos médios relativos a Temperatura média diária e Radiação média diária.**

Ensaio	Duração do ensaio (dias)	Temperatura média diária (°C)	Radiação média diária (MJ m <sup>-2</sup> )
1º Ensaio realizado ao ar livre	35	19,03	8,79
2º Ensaio realizado ao ar livre	41	17,28	12,04
1º Ensaio realizado em estufa*	52	13,16	2,55 - 2,04
2º Ensaio realizado em estufa*	56	10,81	3,27 – 2,62

\* Os dados relativos à radiação média diária nos ensaios realizados em abrigos com cobertura de plástico são apresentados sob a forma de intervalo, correspondendo o primeiro valor do intervalo a uma redução de 15% da radiação média diária e o segundo a 20%.

Não foi possível encontrar diferenças significativas entre modalidades relativamente ao peso seco e peso fresco (quadro 22).

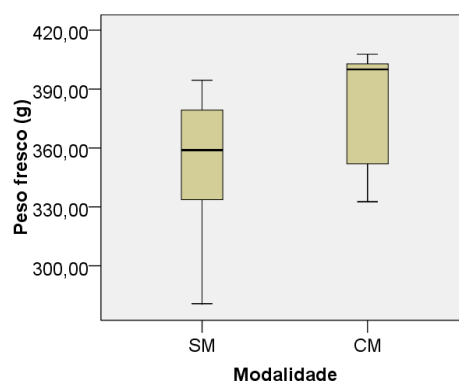
**Quadro 22 - Valores médios de Peso seco (g) e de Peso fresco (g) por modalidade e ensaio, resultados do tratamento estatístico.**

	Modalidade	Valor médio de peso seco (g)	Valor médio de peso fresco (g)
<b>1º Ensaio de campo em ar livre</b>	SM	15,654 a*	414,85 a**
	CM	15,544 a*	399,53 a**
<b>2º Ensaio de campo em ar livre</b>	SM	23,600 a*	594,98 a*
	CM	21,632 a*	567,11 a*
<b>1º Ensaio de campo em estufa</b>	SM	15,668 a*	352,38 a**
	CM	17,367 a*	381,26 a**
<b>2º Ensaio de campo em estufa</b>	SM	26,980 a*	639,95 a*
	CM	27,363 a*	662,18 a*

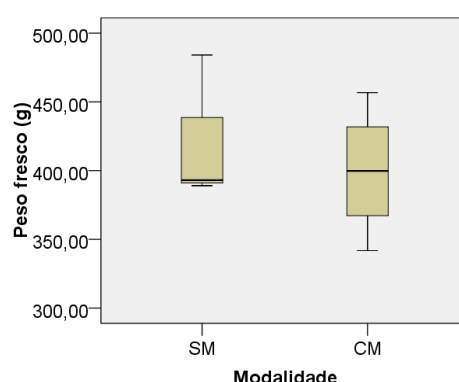
Médias seguidas de letras diferentes nas colunas de cada um dos ensaios indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05

\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso ao teste paramétrico T-student.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney



**Gráfico 5 - Peso fresco (g) das modalidades do 1º ensaio de campo em estufa.**



**Gráfico 6 - Peso fresco (g) das modalidades do 1º ensaio de campo em ar livre.**

No que respeita às análises foliares e exportações de macronutrientes (quadro 23), salienta-se que não foram identificadas diferenças significativas ao nível dos teores de N em formas orgânicas entre as modalidades de cada ensaio. Este facto revela que o reforço da adubação com Mo não se traduziu por si só no aumento das taxas de assimilação do N e consequentemente na produtividade da cultura, pois é esta taxa de assimilação de N que controla a taxa de crescimento da cultura (Mengel *et al*, 2001).

Apenas foram identificadas diferenças significativas ao nível dos teores de cálcio presentes nos tecidos e exportados pelas alfaces do 2º ensaio de campo realizado ao ar livre, sendo que a modalidade onde não se procedeu ao reforço da adubação com Mo apresentou um teor de cálcio superior ao teor de cálcio da modalidade onde se procedeu ao reforço.

Nos ensaios de campo realizados ao ar livre, observou-se que a adubação foliar com Mo promoveu a diminuição das exportações de todos os macronutrientes, no entanto isso só se verificou no caso do K e do Mg no segundo ensaio. Este cenário inverteu-se nos ensaios de campo realizados em estufa, verificando-se que a adubação foliar promoveu o aumento das exportações de P e K no primeiro ensaio de campo em estufa.

**Quadro 23 - Teores de N, P, K, Ca e Mg nos tecidos da parte aérea e exportação, resultados do tratamento estatístico através do teste paramétrico T-student ou do teste não paramétrico Mann-Whitney (apenas quando surge '\*').**

		<b>N</b>				<b>P</b>			
			%	kg ha <sup>-1</sup>			%	kg ha <sup>-1</sup>	
<b>1ºECAL</b>	SM		4,123	a	77,110	a	SM	0,328	a
	CM		3,930	a	73,465	a	CM	0,320	a
<b>2ºECAL</b>	SM		3,789	a	107,124	a	SM	0,298	a
	CM		3,883	a	99,885	a	CM	0,313	a
<b>1ºECE</b>	SM		4,889	a	76,596	a	SM	0,526	<b>a</b>
	CM		4,885	a	85,053	a	CM	0,574	<b>a</b>
<b>2ºECE</b>	SM		3,806	a	102,466	a	SM	-	-
	CM		3,666	a	100,063	a	CM	-	-
		<b>K</b>				<b>Ca</b>			
			%	kg ha <sup>-1</sup>			%	kg ha <sup>-1</sup>	
<b>1ºECAL</b>	SM		4,900	a*	92,023	a	SM	0,760	a
	CM		4,848	a*	90,480	a	CM	0,723	a
<b>2ºECAL</b>	SM		5,683	<b>a</b>	160,840	<b>a</b>	SM	1,471	<b>a</b>
	CM		5,276	<b>a</b>	134,194	<b>b</b>	CM	1,278	<b>b</b>
<b>1ºECE</b>	SM		8,806	<b>a</b>	137,589	<b>b</b>	SM	-	-
	CM		9,073	<b>a</b>	162,333	<b>a</b>	CM	-	-
<b>2ºECE</b>	SM		8,274	a	223,785	a	SM	1,333	a
	CM		8,311	a	226,568	a	CM	1,325	a
		<b>Mg</b>							
			%	kg ha <sup>-1</sup>					
<b>1ºECAL</b>	SM		0,365	a	6,845	a	1ºECAL – 1º ensaio de campo em ar livre;		
	CM		0,348	a	6,480	a			
<b>2ºECAL</b>	SM		0,443	<b>a</b>	12,538	<b>a</b>	2ºECAL – 2º ensaio de campo em ar livre;		
	CM		0,410	<b>a</b>	10,409	<b>b</b>			
<b>1ºECE</b>	SM		-	-	-	-	1ºECE – 1º ensaio de campo em estufa;		
	CM		-	-	-	-			
<b>2ºECE</b>	SM		0,336	a	9,053	a	2ºECE – 2º ensaio de campo em estufa.		
	CM		0,323	a	8,778	a			

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas de cada um dos ensaios indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05

A comparação dos teores de nutrientes nos solos de cada modalidade revelaram que o reforço com Mo promoveu a existência de diferenças significativas entre modalidades ao nível dos teores de fósforo (apenas no 1º ensaio de campo em ar livre), superiores nos solos da modalidade SM, e ferro (apenas no 2º ensaio de campo em ar livre), superiores nos solos da modalidade CM (quadro 24).

**Quadro 24 - Teores médios de fósforo e de ferro ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontrados no solo do 1º e 2º ensaios de campo ao ar livre, respectivamente, e valores de significância atribuída pelo teste “t-student” à diferença entre modalidades**

Mod.	Teor médio de P ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Significância	Mod.	Teor médio de Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Significância
SM	377,32	0,038	SM	331,60	0,027
CM	342,54		CM	364,10	

No quadro 25 encontram-se disponíveis as produtividades médias obtidas, as respectivas exportações médias dos macronutrientes e as exportações de referência para a variedade. Através deste quadro é possível constatar-se que as exportações dos ensaios realizados ao ar livre são inferiores aos valores recomendados para as produções obtidas, principalmente o P e K. Nos casos dos ensaios realizados em estufa os valores foram idênticos.

**Quadro 25 - Exportação média de nutrientes pela parte aérea das alfaves de cada ensaio e modalidade. Exportações de referência de acordo com a produção esperada.**

		Produção ( $\text{t ha}^{-1}$ )	N ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	$\text{P}_2\text{O}_5$ ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	$\text{K}_2\text{O}$ ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	CaO ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	MgO ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
<b>1º Ensaio de campo em ar livre</b>	SM	48,30	77,11	14,22	110,42	19,88	11,37
	CM	47,94	73,47	13,72	108,58	18,75	10,76
<b>2º Ensaio de campo em ar livre</b>	SM	71,40	107,12	19,33	193,01	58,25	20,82
	CM	68,05	99,89	18,27	161,03	45,91	17,28
<b>1º Ensaio de campo em estufa</b>	SM	35,24	76,60	18,92	165,11		
	CM	38,13	85,05	24,73	194,80		
<b>2º Ensaio de campo em estufa</b>	SM	64,00	102,46	-	268,54	50,11	15,02
	CM	66,22	100,06	-	271,88	50,39	14,57
<b>Exportações de referência var. capitata.</b>		34	63	25	137	17	5
		42	80	40	170	40	10
		57	109	91	221	55	13

Fonte: adaptado de Maroto (2002); Santos (2002); Almeida (2006).

### 6.1.2. Acumulação de nitratos em diferentes variedades e linhas de alface

Estes resultados, disponibilizados juntamente com o tratamento estatístico no anexo 6, espelham os impactos que os factores genéticos têm na acumulação de nitratos nos diferentes tipos de alfaces, uma vez que todas foram produzidas no mesmo sector e sob as mesmas condições climáticas, edáficas e nutricionais.

**Quadro 26 - Valores médios de nitratos acumulados na parte aérea das linhas de alfaces pertencentes às duas variedades estudadas.**

Variedade	Linha	Nitratos acumulados na parte aérea (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kg <sup>-1</sup> de matéria verde)			
		1º Ensaio de campo		2º Ensaio de campo	
<i>capitata</i>	'Forlina Rz'	1746,70	a	1569,91	b
	'Teide Rz'	1504,31	ab	1303,25	b
	'Emocion Rz'	1188,77	b	1171,97	b
<i>acephala</i>	'Kitare Rz'	1412,75	ab	1493,95	b
	'Ribai Rz'	1704,53	a	2177,85	a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05.

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Scheffe.

Nos dois ensaios de campo realizados foram encontradas diferenças significativas entre as variedades e as linhas de alfaces estudadas (quadro 26).

Assim, dentro da var. *capitata* a linha 'Forlina Rz' foi a que demonstrou uma maior tendência para a acumulação de nitratos e a linha 'Emocion Rz' a que apresentou tendencialmente menos nitratos acumulados. As diferenças entre as duas linhas no entanto apenas foram consideradas significativas no 1º ensaio.

Entre as duas linhas da var. *acephala* estudadas a que demonstrou ser mais susceptível à acumulação de nitratos foi a 'Ribai Rz', tendo mesmo no 2º ensaio acumulado uma quantidade significativamente superior tanto à linha 'Kitare Rz', da sua variedade, como às linhas da var. *capitata*. Estes resultados reflectem possivelmente uma actividade da enzima nitrato-redutase mais baixa nesta linha.

As diferenças observadas entre a 'Forlina Rz' e a 'Emocion Rz' são um exemplo claro de como os factores genéticos influenciam a acumulação de nitratos. A 'Forlina Rz' é uma alface que se caracteriza por "formar" repolho enquanto a 'Emocion Rz' não (figura 9). Esta diferença promove o aumento da acumulação de nitratos uma vez que nas alfaces de repolho as folhas externas promovem o sombreamento das folhas internas (Burns *et al*, 2004). Este sombreamento inibe a activação da enzima nitrato-redutase e todos os processos relacionados com a assimilação do

carbono, pois limita a passagem da luz.



Figura 9 - Corte transversal de 'Forlina Rz' (A) e 'Emocion Rz' (B).

É de salientar que existiram casos onde os teores de nitratos acumulados na 'Ribai Rz' ultrapassaram os limites máximos de resíduos permitidos pela comissão europeia (quadro 27). Esta situação pode resultar de um plano de adubação azotada desadequado às condições climáticas sentidas (Salomez *et al*, 2009) e às características genéticas desta linha de alfaces.

Quadro 27 - Datas de colheita das amostras nos diversos ensaios, teores máximo de nitratos acumulados nas amostras e limites máximos de resíduos de nitratos permitidos na alface de acordo com a data de colheita.

	Linha	Data de colheita	Teor máximo de nitratos acumulados na parte aérea (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kg <sup>-1</sup> de matéria verde)	
			Obtido	Permitido (LMR)
1º Ensaio de campo em ar livre	'Forlina Rz'	8-10-2010	1844,53	4000
	'Teide Rz'		1642,11	
	'Emocion Rz'		1382,64	
	'Kitare Rz'		1748,24	
	'Ribai Rz'		1920,79	
2º Ensaio de campo em ar livre	'Forlina Rz'	19-05-2011	1818,00	2500
	'Teide Rz'		1575,66	
	'Emocion Rz'		1455,35	
	'Kitare Rz'		1594,84	
	'Ribai Rz'		<b>2566,39</b>	

No 2º ensaio, a 'Emocion Rz' além de ser a que acumulou em média a menor quantidade de nitratos nos vacúolos das suas folhas foi também a alface que apresentou a melhor produtividade (peso seco). Dada a falta de normalidade dos resultados obtidos, no 2º ensaio, todo o tratamento estatístico foi realizado com base em testes não paramétricos e como tal a análise do gráfico 7 é a melhor forma



de ilustrar esta situação. No entanto apresenta-se ainda no quadro 28 os valores médios relativos ao peso seco médio de todas as linhas de alface e os resultados do tratamento estatístico efectuado.

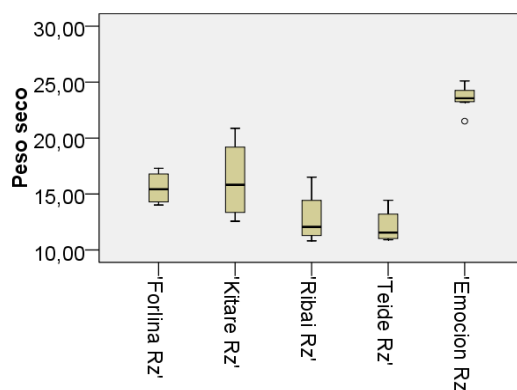


Gráfico 7 - Resultados do peso seco (g) obtidos no 2º ensaio de campo.

Quadro 28 - Valores médios relativos ao peso seco por alface (g) e das linhas e variedades estudadas, resultados do tratamento estatístico efectuado.

Variedade	Linha	Peso Seco**
<i>capitata</i>	'Forlina Rz'	11,25 b
	'Teide Rz'	5,00 c
	'Emocion Rz'	20,50 a
<i>acephala</i>	'Kitare Rz'	11,75 bc
	'Ribai Rz'	6,00 bc

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

Ainda de acordo com o quadro 28, não existem diferenças significativas entre as linhas da var. *acephala* e as linhas 'Forlina Rz' e 'Teide Rz' da var. *capitata*.

Salienta-se que as linhas 'Teide Rz' e 'Ribai Rz' são as que tendem a apresentar uma produtividade mais baixa (gráfico 7) e apresentam entre si a particularidade de possuírem pigmentos nas suas folhas o que lhes confere uma cor roxa (anexo 1).

O facto da 'Emocion Rz' ser a que apresenta a melhor produtividade, associado ao facto de ser também a que apresenta uma menor quantidade de nitratos acumulados poderá significar que é também a que manifestou uma maior taxa de assimilação de nitratos.

Os resultados das análises foliares comparados com os das exportações das diversas linhas (quadro 29) permitiram constatar o seguinte:

- As linhas da var. *acephala* apresentaram valores idênticos quer nos teores dos elementos na parte aérea quer nas exportações;
- A linha 'Teide Rz' foi a que apresentou tendencialmente a menor exportação dos diversos macronutrientes das linhas das var. *capitata* estudadas e a 'Emocion Rz' a que exportou mais. Este facto que era esperado devido às diferenças encontradas no peso seco;
- A 'Emocion Rz' apesar de ser a alface que exportou maiores quantidades de K, Mg e Cu foi também a que apresentou estes elementos mais diluídos nos seus tecidos;
- Todos os tipos de alface apresentaram níveis de Fe bastante superiores aos definidos por Varennes em 2003 como normais (50-250 ppm) e aos valores recomendados por Maynard e Hochmuth em 2007 (50-150 ppm).

**Quadro 29 - Comparação dos resultados das análises foliares com as exportações de cada elemento pelas diversas linhas e variedades de alfaces estudadas, resultados dos tratamentos estatísticos efectuados.**

Linha	N		P		K	
	%*	(kg ha <sup>-1</sup> )**	%*	(kg ha <sup>-1</sup> )*	%**	(kg ha <sup>-1</sup> )*
'Forlina Rz'	4,06 a	75,66 b	0,37 a	6,90 ba	7,18 ab	133,87 ab
'Teide Rz'	3,57 a	51,51 c	0,28 b	3,99 c	7,47 a	108,56 b
'Emocion Rz'	3,79 a	107,12 a	0,30 b	8,44 a	5,68 c	160,84 a
'Kitare Rz'	3,88 a	77,29 abc	0,31 b	6,04 bd	6,49 b	126,64 ab
'Ribai Rz'	3,85 a	58,74 c	0,31 b	4,72 cd	6,97 abc	104,36 b

Linha	Ca		Mg		Fe	
	%*	(kg ha <sup>-1</sup> )*	%**	(kg ha <sup>-1</sup> )*	(mg kg <sup>-1</sup> )*	(g ha <sup>-1</sup> )*
'Forlina Rz'	1,58 a	29,40 b	0,54 a	10,01 ac	833,78 b	1547,54 a
'Teide Rz'	1,38 a	19,95 c	0,50ac	7,28 bc	1383,38 abc	2080,15 a
'Emocion Rz'	1,47 a	41,61 a	0,44bc	12,54 a	628,59 b	1779,53 a
'Kitare Rz'	1,36 a	26,28 bc	0,42 b	8,18 bc	1860,32 ca	3581,76 a
'Ribai Rz'	1,38 a	20,51 bc	0,46 ab	6,88 b	2046,61 ac	3248,50 a

Linha	Cu		Zn		Mn	
	(mg kg <sup>-1</sup> )**	(g ha <sup>-1</sup> )**	(mg kg <sup>-1</sup> )*	(g ha <sup>-1</sup> )*	(mg kg <sup>-1</sup> )*	(g ha <sup>-1</sup> )**
'Forlina Rz'	16,96 ab	31,82 a	55,17 a	102,99 ab	62,35 ab	115,46 a
'Teide Rz'	20,72 a	31,03 a	53,43 a	79,92 b	74,45 ab	109,73 a
'Emocion Rz'	13,31 b	37,56 a	55,15 a	155,43 a	39,32 b	111,36 a
'Kitare Rz'	19,81 a	37,67 a	64,48 a	124,52 ab	89,19 ab	170,48 a
'Ribai Rz'	20,44 a	32,17 a	64,97 a	101,52 ab	114,67 a	174,53 a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05.

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Scheffe.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

A comparação das exportações realizadas pela parte aérea (quadro 30) com os valores de referência para a exportação total de nutrientes pela parte aérea (quadro 31) das duas variedades abordadas com este estudo mostra que em qualquer das linhas os valores de nutrientes exportados são inferiores aos referenciados tanto para a variedade como para as produtividades obtidas.

**Quadro 30 - Exportação de elementos e produtividade dos diversos tipos de alface. Resultado dos testes estatísticos aplicados ao peso fresco.**

Variedade		<i>capitata</i>			<i>acephala</i>	
Linha		'Forlina Rz'	'Teide Rz'	'Emocion Rz'	'Kitare Rz'	'Ribai Rz'
Peso fresco** (g)		434,24 b	345,02 bc	594,98 a	397,95 bc	325,01 c
Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )		52,11	41,40	71,40	47,75	39,00
Média (kg ha <sup>-1</sup> )	N	75,66	51,51	107,12	77,29	58,74
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	15,80	9,14	19,33	13,83	10,81
	K <sub>2</sub> O	160,64	130,27	193,01	151,97	125,23
	CaO	41,16	27,93	58,25	36,79	28,71
	MgO	16,62	12,08	20,81	13,57	11,42

Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

**Quadro 31 - Valores de referência para a exportação total de nutrientes pela parte aérea da planta.**

Variedade	Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )	N (kg ha <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg ha <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (kg ha <sup>-1</sup> )	CaO (kg ha <sup>-1</sup> )	MgO (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>capitata</i>	20	60	20	100	-	-
	34	63	25	137	17	5
	42	80	40	170	40	10
	57	109	91	221	55	13
	25	52	20	50	-	-

Fonte: adaptado de Maroto (2002); Santos (2002); Almeida (2006).

### 6.1.3. Monitorização do solo da exploração

Os dados anteriores à realização dos ensaios de campo, relativos às características do Regossolo Árico, utilizado nos ensaios de campo em ar livre, e do Calcissolo Leptico, usado nos ensaios de campo em estufa, indicavam a existência de elevados teores de azoto nítrico, fósforo e potássio.

Antes de proceder à análise comparativa das propriedades iniciais e finais do Regossolo Arico é importante referir que entre o primeiro e o segundo ensaio de campo ao ar livre existiu um período de pousio devido às condições climáticas inerentes ao período invernal, salientando-se a forte precipitação observada. Assim, começa-se por destacar que, de acordo com os resultados do quadro 32, existiram algumas alterações nas propriedades do solo.

**Quadro 32 - Propriedades iniciais e finais do Regossolo Arico, solo onde foram realizados os ensaios de campo ao ar livre. Comparação entre os dois períodos.**

Parâmetro	Regossolo Árico (ensaios ao ar livre)		f-i
	Início (i)	Final (f)	
Condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	0,35	0,15	- 0,20
pH( $\text{H}_2\text{O}$ )	7,20	8,04	0,84
pH(KCl)	6,79	7,03	0,24
M. org. ( $\text{g kg}^{-1}$ )	24,60	22,2	- 2,40
$\text{P}_2\text{O}_5$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	462,60	301,00	- 161,60
$\text{K}_2\text{O}$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	241,00	436,55	195,55
N-NH <sub>4</sub> ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,80	2,78	1,98
N-NO <sub>3</sub> ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	58,76	14,71	- 44,05
Microelementos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Fe	236,50	331,61
	Cu	30,90	39,95
	Zn	5,31	5,80
	Mn	192,00	177,29
Bases de Troca ( $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$ )	Ca	13,90	15,89
	Mg	1,69	3,11
	Na	0,54	1,14
	K	0,34	1,01

A condutividade eléctrica e o pH não apresentaram alterações muito expressivas, salientando-se apenas o facto de se verificar um ligeiro aumento do pH associado a um leve aumento de cálcio presente nas bases de troca. Observou-se também uma ligeira diminuição da matéria orgânica e dos teores de manganês.

As alterações mais expressivas que ocorreram neste solo foram ao nível do fósforo, onde se observou uma diminuição dos seus teores do início para o final e o aumento acentuado do teor de Mg

nas bases de troca. Relativamente ao azoto nítrico houve uma diminuição acentuada deste parâmetro, destacando-se que o valor inicial era já muitíssimo elevado.

Em relação ao Calcissolo Leptico onde se desenrolaram os ensaios de campo em estufa, destaca-se que as colheitas de solo para as primeiras análises foram realizadas após uma adubação de fundo com estrume de ovinos (quadro 33).

**Quadro 33 - Propriedades iniciais e finais do Calcissolo Leptico, solo onde foram realizados os ensaios de campo em estufa. Comparação entre os dois períodos.**

Parâmetro	Calcissolo Leptico (ensaios em estufa)		f-i
	1ª Análise de solo após estrumação (i)	Final (f)	
Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )	0,73	0,89	0,16
pH(H <sub>2</sub> O)	8,13	7,99	- 0,14
pH(KCl)	7,33	7,65	0,32
M. org. (g kg <sup>-1</sup> )	20,5	22,7	2,20
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	636,00	1222,60	586,60
K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	1220,00	1730,00	510,00
N-NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	4,59	0,24	- 4,35
N-NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	98,56	11,62	- 86,94
Microelementos (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe	87,80	100,05
	Cu	7,10	8,13
	Zn	7,61	46,72
	Mn	141,90	139,55
Bases de Troca (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Ca	21,38	21,21
	Mg	3,24	4,53
	Na	0,77	1,29
	K	2,45	3,49

Neste solo, observa-se um aumento acentuado dos teores de fósforo e potássio e um decréscimo dos teores de azoto (principalmente do azoto na forma nítrica), não se devendo a efeitos de lixiviação pois é uma cultura realizada num abrigo e regada por gota-a-gota.

Os resultados obtidos sugerem que o plano de adubação parece desadequado uma vez que, de acordo com as amostras de solo iniciais, este solo é bastante rico em fósforo e potássio, não sendo necessário, nestas circunstâncias, o fornecimento destes elementos na solução nutritiva. Facto reforçado pelos aumentos de P e K observados após a realização dos ensaios. Possivelmente este aumento poderá ser responsável pela subida da condutividade eléctrica.

## 6.2. Resultados do ensaio de vasos

No anexo 7 encontram-se todas as informações relativas ao tratamento estatístico e outros dados relativos a este ensaio.

### 6.2.1. Efeitos da adubação foliar com molibdénio em complemento de uma adubação completa por fertirrega na redução da acumulação de nitratos.

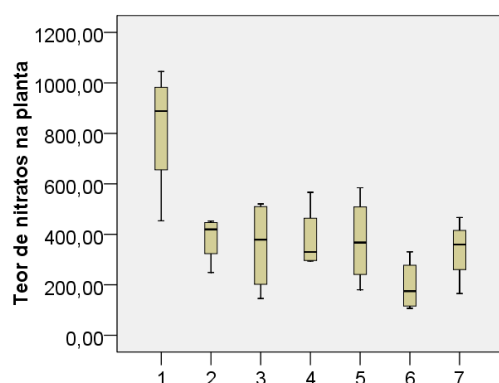
As modalidades que interessa analisar para compreender os efeitos da adubação foliar com Mo em complemento da sua aplicação em fertirrega na redução dos nitratos acumulados nas alfaces são as primeiras quatro. As restantes três modalidades (modalidade 5, modalidade 6 e modalidade 7) visam o estudo dos efeitos do corte de adubação em diferentes períodos antes da colheita e como tal serão abordadas posteriormente.



**Figura 10 - Ilustração do aspecto visual das alfaces de cada modalidade.**

A análise ao teor de nitratos presentes na parte aérea da alface, cujos resultados obtidos por modalidade encontram-se disponibilizados no gráfico 8, mostra que a adubação com Mo, independentemente do método de aplicação, promove a diminuição significativa dos nitratos acumulados nas alfaces, acumulando aproximadamente metade dos nitratos que as alfaces onde não se procedeu à adubação com este micronutriente (quadro 34).

A ocorrência de um menor teor de nitratos acumulados nas plantas onde foi aplicado Mo em comparação com o teor observado nas plantas em que este micronutriente não foi aplicado era esperada, pois o factor limitante do processo de assimilação do azoto na forma nítrica é a actividade da enzima nitrato-redutase (Chen *et al*, 2004). Foi demonstrado em 1969 por Randall, cujos resultados foram publicados por Marschner em 2002, que o suplemento de Mo promove a actividade desta enzima.



**Gráfico 8 - Teor de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades.**

**Quadro 34 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades e definição das modalidades significativamente diferentes.**

Modalidade	Nitratos acumulados nas alfaces*	
1	818,82	a
2	385,10	b
3	355,90	b
4	380,19	b

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

Esperava-se que ocorressem diferenças significativas entre a modalidade 2 (Mo aplicado com a água de rega) e a modalidade 3 (Mo aplicado por adubação foliar). Esperava-se ainda que a modalidade 4, onde se aplicou o Mo na água de rega e na parte aérea por adubação foliar, apresentasse um teor inferior de nitratos acumulados nos vacúolos. Estes resultados não se confirmaram, tal como se pode verificar no quadro 35, o que permite admitir que as quantidades de Mo disponibilizadas nas modalidades 2 e 3 foram suficientes para satisfazer as necessidades fisiológicas das alfaces. Esta suposição é reforçada pela ausência de diferenças significativas entre as três modalidades onde se aplicou molibdénio ao nível da produção, como será discutido posteriormente (quadro 36).

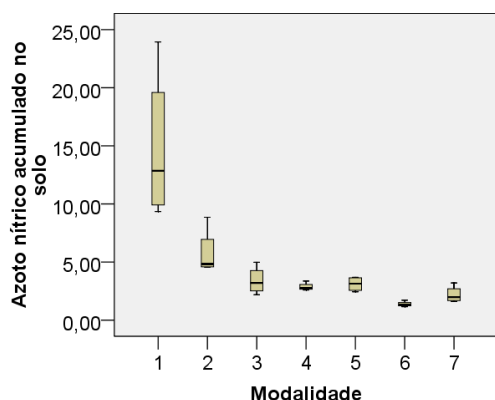
De notar que as suposições relativas aos teores de Mo presentes nas alfaces efectuadas tanto no parágrafo anterior como ao longo desta discussão baseiam-se no pressuposto enunciado por Varennes (2003) de que as plantas possuem a capacidade de absorver quantidades de Mo superiores às suas necessidades (consumo de luxo de Mo). O doseamento do Mo não foi realizado por não se poder realizar nos laboratórios do Instituto Superior de Agronomia e também devido ao seu elevado custo. Desta forma será aceitável admitir que as modalidades onde se aplicou quantidades de Mo inferiores possuam teores inferiores de Mo nos tecidos das alfaces enquanto que alfaces em que se aplicaram teores superiores apresentem teores de Mo mais elevados.

As três modalidades em que se aplicou Mo não apresentaram diferenças significativas para o teor de nitratos acumulados na parte aérea. Este facto pode ser devido a uma idêntica taxa de redução e assimilação de nitratos ou ao facto de terem ocorrido diferentes taxas de absorção.

A forma encontrada para se perceber as taxas de absorção de nitratos nas alfaces das diversas modalidades foi a análise do teor de nitratos acumulados no solo após a realização do ensaio, assumindo-se que maiores quantidades de azoto nítrico acumuladas no solo resultam de uma menor

absorção deste ião pelas alfaces e menores quantidades de azoto nítrico acumuladas a uma maior absorção.

Salienta-se que, ao contrário do que sucedeu com os resultados dos nitratos acumulados nas folhas de alface, os resultados do azoto nítrico acumulado no solo não possuem distribuição normal. Assim, para uma melhor compreensão desses resultados apresenta-se o gráfico 9 onde é possível observar que os solos da modalidade 1 foram os que apresentaram maiores teores de nitratos enquanto os solos da modalidade 4 os menores.



A observação do quadro 35 permite perceber quais os grupos significativamente diferentes e apresenta os valores médios de nitratos acumulados nos solos das diversas modalidades, que embora não possuam o valor que teriam caso se observasse uma distribuição normal, ajudam perceber os resultados obtidos. Este quadro permite ainda a comparação dos nitratos acumulados na planta e no solo.

**Gráfico 9 - Teor de azoto nítrico acumulado no solo das diversas modalidades (mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Kg<sup>-1</sup> de terra fina).**

**Quadro 35 - Teores médios de nitratos acumulados nas alfaces (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> de matéria verde) e de azoto nítrico solo (mg N- NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> de terra fina) das diversas modalidades e definição de diferenças significativas entre modalidades.**

Modalidade	Nitratos acumulados nas alfaces*	Azoto nítrico acumulado no solo **
1	818,82 a	14,75 a
2	385,10 b	5,77 b
3	355,90 b	3,39 bc
4	380,19 b	2,87 c

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05.

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

A comparação entre os nitratos acumulados nos vacúolos das alfaces e os teores de azoto nítrico acumulados no solo permite admitir uma menor redução de nitratos nas folhas das alfaces da modalidade 1 e/ou também uma maior translocação de nitratos da raiz para a parte aérea. Observou-se ainda a existência de duas situações distintas: (i) os teores de azoto nítrico acumulados no solo da

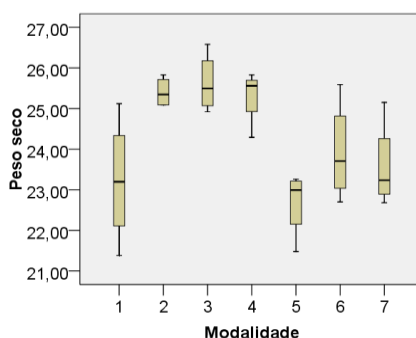


modalidade 1 foram significativamente superiores aos existentes nos solos das restantes modalidades; e (ii) os teores de azoto nítrico presentes nos solos da modalidade 2 são significativamente superiores aos teores dos solos da modalidade 4.

No que respeita à primeira situação, as alfaces da modalidade 1 deveriam possuir teores de Mo inferiores aos das alfaces das restantes modalidades (2, 3 e 4), o que inibiu a actividade da enzima nitrato-redutase e fomentou a acumulação de nitratos. Possivelmente, a acumulação de uma elevada concentração de nitratos nos tecidos das alfaces e/ou a presença  $\text{NH}_4^+$  e outras formas reduzidas de azoto (por exemplo: a glutamina), formados a partir da fotorespiração ou do catabolismo de proteínas, promoveu a inibição da absorção dos nitratos (Maldonado *et al*, 2000). Ou seja, parece que a presença de molibdénio na planta promove a absorção de nitratos, situação referida por Min *et al* (2010).

Em relação à segunda situação, constata-se que onde o molibdénio foi disponibilizado na água de rega (modalidade 2) existem teores de azoto nítrico acumulados no solo superiores aos solos onde o Mo foi disponibilizado tanto pela água de rega como por adubação foliar (modalidade 4). Este cenário, ao não se traduzir em diferenças significativas nos teores de nitratos acumulados nas folhas de alface, permite supor que a modalidade 2 apresenta uma taxa de redução de nitratos superior à modalidade 4. Por outro lado, estes resultados sugerem que o complemento da adubação feita por fertirrega com aplicações foliares de Mo (modalidade 4) seja a mais vantajosa do ponto de vista ambiental, pois foi a modalidade que aparentemente permitiu a diminuição dos nitratos acumulados na planta ao mesmo tempo que promoveu uma melhor eficiência de utilização dos nitratos aplicados nas diversas adubações. Salienta-se que os nitratos são facilmente lixiviáveis e que por esse motivo constituem objecto de grande preocupação com as possíveis contaminações de águas subterrâneas e com todas as consequências inerentes a este problema (Amaro, 2003).

Os resultados obtidos relativos à produtividade (peso seco) revelaram que as alfaces da modalidade 1 apresentaram em média uma produtividade inferior às observadas nas modalidades onde se aplicou Mo (gráfico 10). Apenas se observaram diferenças significativas entre as modalidades 1 e 3 (quadro 36).



**Gráfico 10 - Resultado do peso seco (g) das diversas modalidades.**

Esta situação não era de todo esperada. Sabendo-se que na alface a produtividade aumenta de acordo com a síntese de compostos orgânicos azotados (Mengel *et al*, 2001), seria de esperar que a presença de Mo no plano de adubação contribuisse para se observar um aumento da produtividade significativamente superior em todas as modalidades onde se aplicou Mo.

Na análise dos quadros 36 e 35 percebe-se que a aplicação de Mo parece ser mais eficiente quando aplicada exclusivamente pela adubação foliar, pois apesar de não ser, aparentemente, a modalidade com maior taxa de redução de nitratos, é a que apresenta a melhor produtividade.

**Quadro 36 - Peso seco médio (g) de cada alface e diferenças significativas existentes entre as diversas modalidades.**

Modalidade	Peso Seco*
1	23,2 b
2	25,4 ba
3	25,6 a
4	25,3 ba

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

Os resultados das análises foliares e das extracções dos diversos elementos encontram-se sintetizados no quadro 37 e a sua comparação permite retirar mais algumas conclusões. A que provoca maior estranheza é o facto de não existirem diferenças significativas nos teores de azoto e nas exportações para as diversas modalidades ensaiadas. O azoto orgânico surge em consequência da incorporação do  $\text{NH}_4^+$  pelo ciclo GS-GOGAT. Na modalidade 1 a origem desta forma de azoto deverá ser à custa da redução dos nitratos (embora numa percentagem mais reduzida que as restantes modalidades) e complementada principalmente pela absorção desta forma de azoto e possivelmente, em menor expressão, através do catabolismo de proteínas e da fotorespiração (Maldonado *et al*, 2000; Blasco *et al*, 2010). A fotorespiração é uma via metabólica que através do consumo de ATP (Heldt, 1997) é capaz de produzir vinte vezes mais  $\text{NH}_4^+$  que a redução do  $\text{NO}_3^-$  (Blasco *et al*, 2010).

A possibilidade da planta recorrer à fotorespiração como meio de evitar situações de carências de N e garantir o desenvolvimento normal da alface iria ainda promover uma outra situação que ajudaria a compreender o facto de existir um teor de nitratos no solo superior na modalidade 1 comparativamente com as restantes modalidades, que se prende com uma menor disponibilidade energética para a absorção de nitratos pelas raízes. A energia (ATP) é necessária para manutenção do gradiente do potencial electroquímico de  $\text{H}^+$  essencial para permitir o simporte realizado pela

bomba de prótons (Maldonado *et al*, 2000; Miller *et al*, 2004). A menor disponibilidade energética resultaria não só pelo facto de haver um elevado consumo energético na fotorrespiração mas também porque a fotorrespiração resulta da oxidação da enzima ribulose bifosfato-carboxilase (Rubisco). Esta enzima une-se ao O<sub>2</sub> em vez de se unir ao CO<sub>2</sub>, transformando-a numa consumidora de energia em vez de uma produtora de energia, ou seja, enquanto a enzima estiver oxidada não é possível existir fotossíntese (Heldt, 1997).

Através do quadro 37 observa-se ainda que a aplicação de Mo promove: a diluição do fósforo; a diluição do potássio, desde que não seja em quantidades elevadas como no caso da modalidade 4; e por fim a diminuição da absorção de Cu pela alfaca.

**Quadro 37 - Teores médios de elementos (%) presentes nos tecidos da parte aérea das alfices das quatro modalidades e exportações médios (mg vaso<sup>-1</sup>) efectuadas pelas mesmas.**

Mod.	N		P		K	
	% *	mg vaso <sup>-1</sup> **	% **	mg vaso <sup>-1</sup> *	% **	mg vaso <sup>-1</sup> *
1	2,950 a	684,60 a	0,198 a	45,71 a	3,878 a	899,75 a
2	2,700 a	685,72 a	0,163 b	41,63 a	3,438 b	872,82 a
3	2,840 a	728,20 a	0,173 b	44,43 a	3,498 b	896,60 a
4	2,743 a	693,67 a	0,165 b	41,66 a	3,668 a	928,37 a

Mod.	Ca		Mg		Fe	
	% *	mg vaso <sup>-1</sup> *	% *	mg vaso <sup>-1</sup> *	mg kg <sup>-1</sup> **	mg vaso <sup>-1</sup> **
1	1,608 a	373,66 a	0,645 a	149,23 a	368,20 a	8,64 a
2	1,568 a	398,51 a	0,583 a	148,06 a	424,03 a	10,78 a
3	1,633 a	418,21 a	0,633 a	161,93 a	360,40 a	9,25 a
4	1,588 a	401,26 a	0,615 a	155,63 a	569,58 a	14,49 a

Mod.	Cu		Zn		Mn	
	mg kg <sup>-1</sup> **	mg vaso <sup>-1</sup> **	mg kg <sup>-1</sup> *	mg vaso <sup>-1</sup> **	mg kg <sup>-1</sup> *	mg vaso <sup>-1</sup> *
1	8,93 a	0,21 a	51,33 a	1,19 a	60,90 a	1,42 a
2	5,25 b	0,13 b	43,03 a	1,09 a	64,80 a	1,65 a
3	3,95 b	0,10 b	46,05 a	1,18 a	63,73 a	1,64 a
4	4,35 b	0,11 b	45,78 a	1,16 a	74,95 a	1,90 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam a existência de diferenças significativas entre si p=0,05.

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

Estes resultados permitem levantar uma série de hipóteses que enunciaremos de seguida mas que, por fugirem ao âmbito do presente estudo, não foram validadas por meio de técnicas específicas para o efeito.

Assim, parece que as alfaces da modalidade 1 necessitariam de maiores quantidades de energia na parte aérea:

- O fósforo desempenha um importante papel em todo o metabolismo energético sendo um constituinte da ATP e do NAD(P)H (Bonilla, 2000; Varennes, 2003) e em elevadas quantidades pode estimular a fotossíntese (Varennes, 2003).
- O K desempenha funções importantes na fotossíntese e respiração: decisivo nos processos de abertura e encerramento dos estomas, estimula o fluxo de electrões em cadeias transportadoras e aumenta a actividade da enzima Rubisco (Bonilla, 2000; Varennes, 2003).
- O cobre encontra-se presente em diversas proteínas e enzimas implicadas nos processos de oxidação e redução, sendo as mais importantes a plastocianina – proteína que transporta electrões do fotossistema II para o I – e a citocromo-oxidase – proteína que transfere electrões para o oxigénio nas mitocôndrias (Bonilla, 2000; Mengel et al, 2001; Varennes, 2003).

Em relação ao doseamento de proteínas e à avaliação da actividade da enzima nitrato-redutase, pela observação do quadro 38, verificou-se que de um modo geral as folhas de alface apresentam uma concentração elevada de proteínas e uma reduzida produção de nitritos pelas mesmas, apontando para uma maior actividade da enzima nitrato-redutase ao nível das raízes.

Não foi possível validar esta hipótese devido a uma contaminação das amostras de raiz com água durante o seu processamento que provocou uma diluição não quantificável dos extractos de proteína, levando ao abandono destas amostras.

Observaram-se ainda alguns casos em que os extractos continham um baixo teor de proteínas e uma elevada produção de nitritos, facto que poderá ser causado pelo facto das folhas que compunham cada amostra poderem não apresentar exactamente a mesma idade.

Ainda assim, é importante salientar que devido ao elevado teor de água e reduzida matéria seca das amostras, foi necessário modificar o protocolo. Durante a extracção foi necessário utilizar o dobro de amostra do previsto e foi necessário incubar-se 18 horas em banho-maria a 30°C em vez dos 15 minutos descritos no protocolo.

Observou-se ainda que o tampão de extracção das proteínas interferiu no processo de doseamento de proteínas totais, tendo sido necessário calcular o contributo do tampão de extracção para o total de proteínas encontrado. A utilização deste tampão (Liu et al., 2008) que fora escolhido por conferir

maior estabilidade às amostras nos processos repetidos de congelação e descongelação, revelou-se assim pouco adequada a este material vegetal.

Salienta-se também que no doseamento dos nitritos, devido à extensão da reacção, teve de proceder-se a diluições de forma a permitir a quantificação por espectrofotometria de absorção molecular (540 nm).

Estas alterações do protocolo podem ter influenciado os resultados obtidos, reforçando-se desta forma a necessidade de validar estes resultados.

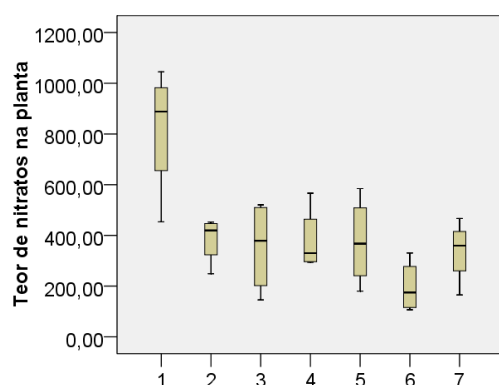
**Quadro 38 - Concentração média de proteínas contidas nos extractos e respectivas produções médias de nitritos por hora.**

	<b>Concentração média de proteínas nos extractos</b> (mg de proteína ml <sup>-1</sup> de extracto)	<b>Produção média de nitritos pelas proteínas contidas nos extractos por hora</b> (mg de NO <sub>2</sub> ml <sup>-1</sup> de extracto h <sup>-1</sup> )
<b>Modalidade 1</b>	0,225	1,148
	0,480	0,561
	0,707	0,372
	0,547	0,570
<b>Modalidade 2</b>	0,657	0,395
	0,486	0,599
	0,822	0,299
	0,450	0,593
<b>Modalidade 3</b>	0,578	0,447
	0,461	0,547
	0,975	0,247
	0,691	0,344
<b>Modalidade 4</b>	0,637	0,369
	0,800	0,273
	0,566	0,484
	0,365	0,784

### 6.2.2. Efeitos do corte de adubação azotada antes da colheita

As modalidades que interessam analisar para averiguar os efeitos do corte de adubação azotada antes da colheita são as modalidades 5 (modalidade 1 com corte de adubação 3 dias antes da colheita), modalidade 6 (modalidade 4 com corte de adubação 1 semana antes da colheita) e modalidade 7 (modalidade 4 com corte de adubação 3 dias antes da colheita).

Tal como sugeriram Weimin *et al* (1998), Seginer (1999) e Burns *et al* (2004), o corte de adubação antes da colheita promoveu a redução dos nitratos acumulados nos vacúolos das folhas de alface. Como se pode observar no gráfico 11, na modalidade 5 o teor de nitratos foi reduzido, em média, para aproximadamente metade, quando comparado com os resultados da modalidade 1; a modalidade 6 também apresentou aproximadamente metade dos nitratos existentes na modalidade 4; por fim a modalidade 7 não obteve resultados tão interessantes, observando-se apenas uma ligeira redução em relação à modalidade 4. Os únicos resultados que foram considerados significativos foram os obtidos entre a modalidade 5 e a 1, sendo que também não se observaram diferenças significativas entre as três modalidades em que os cortes foram testados (quadro 39).



**Gráfico 11 - Teor de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ Kg}^{-1}$  de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades.**

**Quadro 39 - Teor médio de nitratos ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) acumulados nas alfaces das diversas modalidades e definição das modalidades significativamente diferentes.**

Nitratos acumulados nas alfaces*		
Modalidade	(mg de $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde)	
1	818,82	a
5	374,79	b
4	380,19	b
6	196,65	b
7	337,76	b

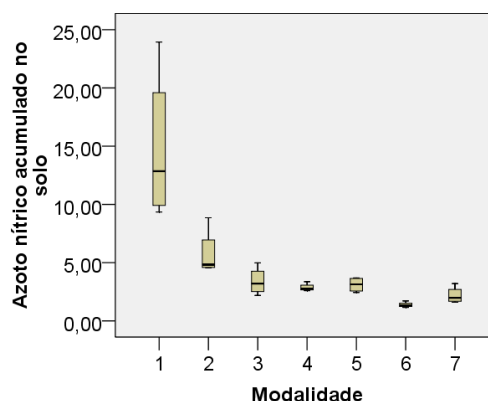
Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

Sabendo que as necessidades de molibdénio pelas plantas são muito baixas (Varennnes, 2003) os resultados da modalidade 5 podem significar que o Mo presente num solo com estas características é suficiente para permitir a actividade de uma quantidade de enzimas nitrato-redutase suficientes para reduzir grande parte dos nitratos absorvidos desde que se proceda a um corte de adubação pelo menos três dias antes da colheita.

Ao observarmos no gráfico 12 os teores de nitratos acumulados no solo após a realização do ensaio constata-se que o corte de adubação também promoveu a redução dos nitratos no solo. Os solos da modalidade 6 foram os que apresentaram menos nitratos acumulados no solo após a colheita (quadro 40).

Estes resultados indicam que as alfaces continuaram a absorver nitratos após o corte de adubação, contribuindo desta maneira para a melhoria da qualidade dos solos e ao mesmo tempo da qualidade da alface. Segundo Chiesa (2003), o teor de nitratos acumulados nas folhas de alface é um dos parâmetros de qualidade.



**Gráfico 12 - Teor de azoto nítrico ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de terra fina) acumulados nos solos das diversas modalidades.**

**Quadro 40 - Teores médios de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) e solo ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de terra fina) das diversas modalidades e definição de diferenças significativas entre modalidades.**

<b>Modalidade</b>	<b>Nitratos acumulados nas alfaces*</b> ( $\text{mg de NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de matéria verde)	<b>Azoto nítrico acumulado no solo **</b> ( $\text{mg de N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de terra fina)
<b>1</b>	818,82 a	14,75 a
<b>5</b>	374,79 b	3,10 b
<b>4</b>	380,19 b	2,87 b
<b>6</b>	196,65 b	1,37 c
<b>7</b>	337,76 b	2,19 b

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

Através da análise do quadro 40, percebe-se que em três dias a modalidade 5 reduziu a acumulação de azoto nítrico acumulado no solo em  $11,65 \text{ mg kg}^{-1}$  de terra fina, enquanto a modalidade 7 diminui a acumulação de azoto nítrico em  $0,68 \text{ mg kg}^{-1}$  de terra fina, comparativamente com a modalidade 1 e 4 respectivamente. Já o corte de adubação uma semana antes da colheita permitiu reduzir a acumulação de azoto nítrico no solo em  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de terra fina, em relação à modalidade 4. Estas diferenças indicam que as alfaces da modalidade 5 absorveram nitratos a uma velocidade mais elevada que as alfaces das modalidades 6 e 7, o que sugere que utilizaram preferencialmente sistemas de transporte de baixa afinidade para os nitratos (LATS), devendo neste caso a concentração de nitrato na solução do solo ser superior a  $1 \text{ mmol}$ , enquanto as alfaces das

modalidades 6 e 7 deverão ter utilizado preferencialmente sistemas de transporte de alta afinidade para os nitratos (HATS), para concentração de nitratos na solução do solo inferior a 1 mmol (Forde 2000; Wang *et al*, 2006).

Uma vez que a produtividade da cultura está relacionada com a taxa de assimilação dos nitratos (Mengel *et al*, 2001) seria de esperar que o facto das alfaces que recorrem a sistemas HATS, por absorverem teores muito inferiores de nitratos, apresentassem uma redução da produtividade. No entanto isto não se verificou de todo, ao nível do peso seco não observaram diferenças significativas ao contrário do que sucedeu no peso fresco (quadro 41) onde a modalidade 6 apresentou um peso significativamente inferior à modalidade 4. Salienta-se que o peso fresco na modalidade 5 é considerada igual ao peso fresco da modalidade 1, sucedendo o mesmo em relação às modalidades 7 e 4.

Estes resultados indicam-nos que, recorrendo ao corte de adubação três dias antes da colheita, é possível obter uma produtividade máxima quando se adopta um plano de adubação que contemple molibdénio e uma produtividade subótima quando não se contempla este micronutriente no plano de adubação

**Quadro 41 - Valores médios de Peso seco (g) e Peso fresco (g) em cada modalidade.**

Modalidade	Peso seco*	Peso fresco*
1	23,2 ab	382,8 ab
5	22,7 b	378,8 ab
4	25,3 a	396,1 a
6	23,9 ab	362,6 b
7	23,6 ab	394,8 a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para  $p=0,05$ .

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

Por outro lado, tal como se pode observar no quadro 42, onde se compara a análise ao teor de N (%) presente na parte aérea das alfaces e das exportações de cada modalidade ( $\text{mg N vaso}^{-1}$ ), verifica-se que o corte de adubação seja três dias antes da colheita (modalidade 5 e 7) ou uma semana antes (modalidade 4) promove a diminuição da extracção de N pelas alfaces. No entanto esta diminuição só foi significativa nas modalidades 6 e 7.

Assim, comparando as extracções com os resultados das análises foliares, observou-se a existência de efeitos de concentração de N na modalidade 7 (corte de adubação efectuada na modalidade 4 três dias antes da colheita) e a diminuição significativa do N na parte na modalidade 6 (corte de adubação efectuada na modalidade 4 uma semana antes da colheita).



A análise do quadro 42 permite ainda observar que o corte de adubação efectuada na modalidade 4 três dias antes da colheita promove a existência de efeitos de concentração de P e o corte de adubação efectuada na modalidade 4 uma semana antes da colheita promove a existência de efeitos de diluição de Mg na parte aérea.

**Quadro 42 - Teores médios de elementos (%) presentes nos tecidos da parte aérea das alfaces das quatro modalidades e exportações médios (mg vaso<sup>-1</sup>) efectuadas pelas mesmas.**

Mod.	N		P		K	
	% *	mg vaso <sup>-1</sup> **	% **	mg vaso <sup>-1</sup> *	% **	mg vaso <sup>-1</sup> *
1	2,950 a	684,60 ab	0,198 a	45,71 a	3,878 ac	899,75 a
5	2,915 a	661,37 ab	0,180 a	41,02 a	3,898 a	883,38 a
4	2,743 a	693,67 a	0,165 b	41,66 a	3,668 ac	928,37 a
6	2,338 b	558,24 c	0,170 ab	40,94 a	3,538 bc	844,99 a
7	2,768 a	651,71 b	0,185 a	43,31 a	3,853 a	906,85 a

Mod.	Ca		Mg		Fe	
	% *	mg vaso <sup>-1</sup> *	% *	mg vaso <sup>-1</sup> *	mg kg <sup>-1</sup> **	mg vaso <sup>-1</sup> **
1	1,608 ab	373,66 a	0,645 a	149,23 a	368,20 a	8,64 a
5	1,693 ab	383,75 a	0,653 a	148,11 a	376,75 a	8,59 a
4	1,588 ab	401,26 a	0,615 a	155,63 a	569,58 a	14,49 a
6	1,528 b	365,60 a	0,573 b	137,19 a	522,03 a	12,47 a
7	1,768 a	416,74 a	0,655 a	154,53 a	490,93 a	11,53 a

Mod.	Cu		Zn		Mn	
	mg kg <sup>-1</sup> **	mg vaso <sup>-1</sup> **	mg kg <sup>-1</sup> *	mg vaso <sup>-1</sup> **	mg kg <sup>-1</sup> *	mg vaso <sup>-1</sup> *
1	8,93 a	0,21 a	51,33 ab	1,19 a	60,90 a	1,42 a
5	8,35 ac	0,19 ac	55,45 a	1,25 a	67,65 a	1,54 a
4	4,35 b	0,11 b	45,78 b	1,16 a	74,95 a	1,90 a
6	5,23 bc	0,13 bc	46,63 ab	1,11 a	69,63 a	1,67 a
7	5,15 b	0,12 bc	54,18 ab	1,28 a	71,48 a	1,68 a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam a existência de diferenças significativas entre si para p=0,05.

\* Estudo da existência de diferenças significâncias com recurso ao teste paramétrico ANOVA - teste de Tukey.

\*\* Estudo da existência de diferenças significativas com recurso aos testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

Em relação ao doseamento de proteínas e à avaliação da actividade da enzima nitrato-redutase, verificou-se que os cortes de adubação efectuados não alteraram em nada a situação anteriormente descrita. Mais uma vez observaram-se teores elevados de proteínas nos extractos e uma reduzida produção de nitritos (quadro 43), revelando novamente uma baixa actividade da enzima nitrato-redutase nas folhas.

**Quadro 43 - Concentração média de proteínas contidas nos extractos e respectivas produções médias de nitritos por hora.**

	<b>Concentração média de proteínas nos extractos</b> (mg de proteína ml <sup>-1</sup> de extracto)	<b>Produção média de nitritos pelas proteínas contidas nos extractos por hora</b> (mg de NO <sub>2</sub> ml <sup>-1</sup> de extracto h <sup>-1</sup> )
<b>Modalidade 1</b>	0,225	1,148
	0,480	0,561
	0,707	0,372
	0,547	0,570
<b>Modalidade 5</b>	0,617	0,421
	0,641	0,377
	0,534	0,506
	0,401	0,677
<b>Modalidade 4</b>	0,637	0,369
	0,800	0,273
	0,566	0,484
	0,365	0,784
<b>Modalidade 6</b>	0,576	0,431
	0,619	0,396
	0,771	0,331
	0,561	0,424
<b>Modalidade 7</b>	0,734	0,299
	0,844	0,269
	0,686	0,321
	0,690	0,370

## 7. CONCLUSÕES

Após a realização deste trabalho e atendendo aos resultados obtidos nos ensaios realizados, concluímos que este tipo de estudos deve ser efectuado, sempre que possível, durante um período de tempo mais alargado de forma a permitir obter um maior número de resultados e realizar um maior número de ensaios, em locais variados, por forma a reduzir os efeitos da grande variabilidade de factores edafo-climáticos, genéticos e culturais que geralmente se fazem sentir quando se realizam estudos desta natureza.

Os ensaios de campo que realizámos reflectiam apenas duas situações edafo-climáticas, com ligeiras diferenças no que se refere às práticas culturais utilizadas, enquanto o ensaio de vasos se reportou exclusivamente a uma situação edafo-climática sem variação de mais nenhum factor. Assim, é facilmente compreensível que este aspecto condicionou todo o trabalho aqui apresentado, não se podendo generalizar os resultados e conclusões obtidas para os infinitos factores edafo-climáticos, culturais e genéticos existentes.

Contudo, e apesar dos referidos condicionalismos, este trabalho permitiu uma avaliação, embora superficial, do desempenho da exploração onde se realizaram os ensaios de campo no que respeita ao plano de adubação adoptado, o que poderá vir a facilitar futuras tomadas de decisão por parte dos responsáveis a este nível. Concluiu-se que o plano de adubação utilizado se adequou melhor à linha de alfaces 'Emocion Rz', que mostrou ser a que exporta mais elementos, e menos bem à linha 'Ribai Rz', podendo mesmo nesta linha existir situações em que são ultrapassados os limites máximos permitidos para o teor em nitratos na parte aérea.

No ensaio de vasos procedeu-se à simulação das modalidades do ensaio de campo, sendo que a "modalidade 2" correspondia à modalidade "SM" dos ensaios de campo, onde o molibdénio foi fornecido apenas na água de rega, e a "modalidade 4" à modalidade "CM" dos ensaios de campo, onde a aplicação de molibdénio era fornecido na água de rega e por adubação foliar. Desta forma os ensaios de vaso apoiaram os resultados obtidos pelos ensaios de campo, verificando-se que a aplicação de Mo por adubação foliar em complemento da sua adubação em fertirrega não permite reduzir a acumulação de nitratos acumulados nas folhas de alface. Salienta-se, uma vez mais, que esta conclusão é válida para as doses de Mo aplicadas tanto na água de rega como na adubação foliar, sendo eventualmente de esperar conclusões diferentes se as dosagens aplicadas forem alteradas.

Nos ensaios de campo, observou-se que as alfaces produzidas em estufa acumulam mais nitratos que as alfaces produzidas ao ar livre. A causa desta diferença pode atribuir-se à prática de um plano de adubação desadequado à intensidade luminosa existente no local, mais reduzida nos abrigos devido à sua cobertura.

Ainda assim, de acordo com os resultados do ensaio de vasos, parece que a aplicação suplementar de Mo aumenta a actividade da enzima nitrato-redutase uma vez que foram encontrados teores de nitratos significativamente menores no solo das alfaces onde se procedeu ao reforço de adubação comparativamente às alfaces que não foram reforçadas pelo Mo, facto que não foi possível validar convenientemente devido às dificuldades existentes na análise da actividade da enzima.

A adubação foliar com Mo foi a modalidade onde se observou uma redução para cerca de metade da quantidade de nitratos acumulados na planta (de 818,82 para 355,90 mg  $\text{NO}_3^-$   $\text{kg}^{-1}$  de matéria verde) ao mesmo tempo que apresentou a melhor produtividade.

Foi ainda perceptível que a presença de Mo nas alfaces favoreceu, tanto a absorção do azoto nítrico como a sua assimilação. Desta forma, a aplicação de Mo permite aumentar a qualidade das alfaces, uma vez que conduz à redução dos nitratos acumulados nas folhas, e promove a diminuição de impactos negativos no ambiente, que surgem em consequência da lixiviação dos resíduos de nitratos existentes nos solos de culturas ao ar livre .

O ensaio em vasos mostrou ainda a influência clara que o Mo possui na redução dos nitratos acumulados nas folhas de alface e levantou a hipótese da planta utilizar a fotorespiração para produzir ião amónio ( $\text{NH}_4^+$  ) e compensar, de forma limitada, a incapacidade de produzir esta forma de azoto através da redução dos nitratos devido a carência de Mo. Esta hipótese deverá ser confirmada através de estudos direccionados para este objectivo.

Verificou-se ainda que, em situações particulares, a supressão da adubação poderá ser uma solução para reduzir o teor de nitratos presente nos vacúolos das folhas, sendo que em alfaces cujo plano de adubação não contemplou Mo o corte da adubação três dias antes da colheita reduziu para metade o teor de nitratos acumulados (de 818,82 para 374,79 mg  $\text{NO}_3^-$   $\text{kg}^{-1}$  de matéria verde), enquanto que em situações onde o plano de adubação contemplou o Mo pode ser necessário aguardar uma semana para reduzir para metade o teor em nitratos acumulado (de 380,19 para 196,65 mg  $\text{NO}_3^-$   $\text{kg}^{-1}$  de matéria verde).

Observou-se ainda que, numa fertilização com molibdénio, o corte de adubação uma semana antes da colheita possui como grande desvantagem o comprometimento da produtividade da cultura, devendo ser utilizada apenas em situações em que se tema a existência de um excesso de nitratos acumulados nos tecidos da alface.

O estudo dos efeitos das variedades e linhas de alface mostrou, mais uma vez, que a acumulação de nitratos varia entre as var. *capitata* (Emocion Rz; Forlina Rze Teide Rz) e *acephala* (Kitare Rz e Ribai Rz) e entre linhas. Este estudo mostrou que dentro da var. *capitata* a linha com maior tendência a acumular nitratos é a 'Forlina Rz' e a com menor a 'Emocion Rz', muito possivelmente devido à tendência que as folhas externas da 'Forlina Rz' têm para promoverem o ensombramento das folhas

mais novas. Na var. *acephala* a linha com maior propensão é a 'Ribai Rz', sendo aliás a linha com maior facilidade para acumular nitratos de todas as linhas estudadas.

Foi ainda possível constatar-se que, para as condições em que se efectuaram estes ensaios, a 'Emocion Rz' foi a alface mais produtiva e a 'Teide Rz' a menos.

A análise das exportações das diversas linhas nos vários ensaios de campo efectuados mostraram-se quase sempre inferiores às referidas na bibliografia, sendo que não foi possível encontrar uma explicação plausível para este facto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D. (2006). *Manual de culturas hortícolas* (vol. 1). Lisboa, Portugal: Editorial Presença.
- Almeida, D. & Reis, M. (2010). Plásticos e vidro de utilização hortícola. *Vida rural*, 58 (1757), 43-44.
- Amaro, P. (2003). *A protecção integrada*. Lisboa: ISA/Press.
- Anjana, Umar, S. & Iqbal, M. (2009). Factors Responsible for nitrate accumulation: a review. In E. Lichfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, V. Souchère, & C. Alberola (Eds.), *Sustainable agriculture*, 532-550. London: Springer.
- Blasco, B., Rios, J., Cervilla, L., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Rosales, M., Ruiz, J. & Romero, L. (2010). Photorespiration process and nitrogen metabolism in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.): induced changes in response to iodine biofortification. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 477-486.
- Boink, A. & Speijers, G. (2001). Health effects of nitrates and nitrites, a review. *Acta Horticulturae*, 563, 29-36.
- Bonilla, I. (2000). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. In J. Azcón-Bieto, & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal*, 83-98. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burns, I. G., Lee, A. & Escobar-Gutiérrez, A. J. (2004). Nitrate accumulation in protected lettuce. *Acta Horticulturae*, 633, 271-278.
- Byrne, C., Maher, M., Hennerty, M., Mahon, M. & Walshe, P. (2004). Reducing nitrate content of protected lettuce. Retrieved Agosto 26, 2011, from Teagasc Reserch Report: <http://www.teagasc.ie/research/reports/horticulture/4561/eopr-4561.htm>
- Chan, T. (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicology letters*, 200, 107-108.
- Chen, B., Wang, Z., Li, S., Wang, G., Song, H. & Wang, X. (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, 167, 635-643.

- Chiesa, A. (2003). Factors Determining Postharvest Quality of Leafy Vegetables. *Acta Horticulturae*, 604, 519-524.
- Chung, J., Jin, S. & Cho, H. (2005). Low water potential in saline soils enhances nitrate accumulation of lettuce. *Communications in soil science and plant analysis*, 36 (13), 1773-1785.
- Comissão Europeia, *Regulamento (CE) nº 1881/2006*, publicado em Jornal Oficial da União Europeia, L364/5, de 19 de Dezembro.
- Correia, M. (2009). Avaliação de nitratos e nitritos em vegetais. *Segurança e qualidade alimentar*, 7, 14-16.
- Correia, M., Barroso, Â., Barroso, M., Soares, D. & Oliveira, M. (2010). Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry*, 120, 960-966.
- Egnér, H., Riehm, H. & Domingo, W. (1960). Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Böden. II. Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor und Kaliumbestimmung. *Kungliga Lanbrukshögskolans Annaler*, 26, 199-215.
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M. & Makela, S. (1998). Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry*, 31 (4), 195-220.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011). Retrieved April 2011, from FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- Forde, B. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1465), 219-235.
- Gabinete de Planeamento e Política, *Diagnóstico sectorial: Horticultura*, de Fevereiro de 2007.
- Golden, M. & Leifert, C. (1999). Potential risks and benefits of dietary nitrate. In W. Wilson, A. Ball & R. Hinton (Eds.), *Managing risks of nitrates to humans and the environment* (pp. 269-280). Cambridge: Royal society of chemistry.
- Gorska, A., Ye, Q., Holbrook, N. & Zwieniecki, M. (2008). Nitrate control of root hydraulic properties in plants: translating local information to whole plant response. *Plant Physiology*, 148, 1159-1167.
- Hambridge, T. (2003). *Nitrate and nitrite: intake assessment*. Obtido em 2011, de WHO Food Additives Series: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>
- Heitor, A. (2000). Nitratos: saúde/ambiente. *Revista Portuguesa de Nutrição*, 10 (1-2), 76-86.
- Heldt, H. (1997). *Plant biochemistry and molecular biology*. New York: Oxford University Press.

- Hord, N., Tang, Y. & Bryan, N. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 1 - 10.
- Horneck, D. & Miller, R. (1998). Determination of total nitrogen in plant tissue. In Y. Kalra (ed.), *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, 75-83. Florida: CRC Press LLC.
- Horta, J. (1998). Serão os nitratos prejudiciais à saúde?. *Ingenium*, (31),73-74.
- Jackson, L., Burger, M. & Cavagnaro, R. (2008). Roots, nitrogen transformations and ecosystem services. *Annual review of plant biology*, 59, 341 - 363.
- Kaiser, J. & Lewis, A. (1984). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil*, 70, 127-130.
- Kilfoy, B., Zhang, Y., Park, Y., Holford, T., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. & Ward, M. (2011). Dietary nitrate and nitrite and the risk of thyroid cancer in the NIH-AARP diet and health study. *International Journal of Cancer*, 129 (1), 160-172.
- Koenig, R. & Johnson, C. (1942). Colorimetric determination of phosphorus in biological materials. *Ind. Eng. Chem. Anal.* 14, 155.
- Kuang, H., Eck, H. J., Sicard, D., Michelmore, R. & Nevo, E. (2008). Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its RGC2 resistance gene cluster. *Genetics*, 147, 1547-1558.
- Lakanen, E. & Ervio, R. (1971). Comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agr. Finn*, 23, 223-232.
- L'Hirondel, J. & L'Hirondel, J.-L. (2002). *Nitrate and man: toxic, harmless or beneficial?* New York: CABI Publishing.
- Li, H., Duncan, C., Golden, M. & Leifert, C. (1999). Identification of nitrate reducing bacteria from the oral cavity of rats and pigs. In W. Wilson, A. Ball, & R. Hinton (Eds.), *Managing risks of nitrates to humans and the environment*, 259-268. Cambridge: Royal society of chemistry.
- Liu, X.Q., Ko, K.Y., Kim, S.H. & Lee, K.S. (2008). Effect of Amino Acid Fertilization on Nitrate Assimilation of leafy radish and soil chemical properties in high nitrate soil. *Soil and Plant Analysis*. 39, 269-281.
- Lopes, A. & Simões, A., Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas - Direcção-Geral de Protecção das Culturas, *Produção Integrada em hortícolas: família das asteráceas – alface*, de 2006.



- López-Mosquera, M. E., Cabaleiro, F. A., Carballo, M. E. & Sainz, M. J. (2004). Concentración de nitratos en lechuga de otoño y de primavera fertilizada con estiércol deshidratado y granulado de pollo. In M. A. Martins-Loução, & C. Cruz (Eds.), *Actas X simpósio ibérico de nutrição mineral das plantas: nutrição mineral, causas e consequências da dependência da fertilização*, 319-324. Lisboa, Portugal.
- Maas, E. & Hoffman, G. (1977). Crop salt tolerance: current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division, ASCE* 103 (IR 2), 115-134.
- Maathuis, F. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Plant Biology*, 12, 250-258.
- Maldonado, J., Agüera, E. & Vicente, R. (2000). Asimilación del nitrógeno y del azufre. In J. Azcón-Bieto, & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal*, 235-246. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.
- Maroco, J. (2003). *Análise de estatística com a utilização do SPSS* (Vol. 2ª ed.). Lisboa: Edições Sílabo .
- Maroto, J. V. (2002). *Horticultura herbácea especial* (5ª ed.). Seseña, Espanha: Artes Gráficas Cuesta, S.A.
- Marschner, H. (2002). *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press.
- Marti, F. & Munõz, L. (1957). *Flame Photometry*. Londres: Elsevier.
- Maynard, D. N. & Hochmuth, G. J. (2007). *Knott's handbook for vegetable growers* (5ª ed.). United States of America: John Wiley & Sons, INC.
- Mendel, R. (2007). Biology of the molybdenum cofactor. *Journal of Experimental Botany*, 58 (9), 2289-2296.
- Mengel, K. & Kirkby, E. (2001). *Principles of plant nutrition*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Miller, A. & Cramer, M. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and soil*, 274, 1-36.
- Min, Y., Cheng-Xiao, H., Xue-Cheng, S. & Yun-Hua, W. (2010). Influences of Mo on nitrate reductase, glutamine synthetase and nitrogen accumulation and utilization in Mo-efficient and Mo-inefficient winter wheat cultivars. *Agricultural sciences in china*, 9 (3), 355-361.
- Mulvaney, R. (1996). Nitrogen:inorganic forms. In *Methods of soil analysis, Part 3: chemical methods*, 1129-1139. USA: Soil Science Society of America.

- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S., Krapp, A., Daniel-Vedele, F. & Miller, A. (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant physiology*, 142, 1304-1317.
- Ott, K., Koenig, R. & Miles, C. (2008). Influence of plant part on nitrate concentration in lettuce and spinach. *International Journal of Vegetable Science*, 14 (4), 351-361.
- Pavlou, G., Ehaliotis, C. & Kavvadias, V. (2007). Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 111, 319-325.
- Pardo-Marín, O., Yusà-Pelechà, V., Villalba-Martín, P. & Perez-Dasí, J. (2010). Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Additives and Contaminants*, 27 (4), 478-486.
- Póvoas, I. & Barral, M. (1992). Métodos de análises de solos. *Comunicação do Instituto de Investigação Científica Tropical, série de Ciências Agrárias*, 10.
- Powlson, D., Addiscott, T., Benjamin, N., Cassman, K., Kok, T., Grinsven, H., L'hirondel, J.; Avery, A. & Kessel, C. (2008). When does nitrate become a risk for humans? *Journal of Environmental Quality*, 37, 291-295.
- Ralt, D. (2009). Does NO metabolism play a role in the effects of vegetables in health? Nitric oxide formation via the reduction of nitrites and nitrates. *Medical Hypotheses*, 73, 794-796.
- Rubatzky, V. E. & Yamaguchi, M. (1999). *World vegetables: principles, production, and nutritive values* (2<sup>a</sup> ed.). Gaithersburg, United States of America: Aspen Publishers.
- Salomez, J. & Hofman, G. (2009). Nitrogen nutrition effects on nitrate accumulation of soil-grown greenhouse butterhead lettuce. *Communications in soil science and plant analysis*, 40 (1), 620-632.
- Santamaria, P. (2006). Review nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the science of food and agriculture*, 86, 10-17.
- Santos, J. Q. (2002). *Fertilização: fundamentos da utilização dos adubos e correctivos* (3<sup>a</sup> ed.). Mem-Martins, Portugal: Publicações Europa-América.
- Schollenberger, C. & Simon, R. (1945). Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil: ammonium acetate method. *Soil Science*, 59 (1), 13-24.
- Seginer, I., Straten, G. & Buwalda, F. (1999). Lettuce growth limited by nitrate supply. *Acta Horticulturae*, 507, 141-148.

- Shao-ting, D., Yong-song, Z. & Xian-yong, L. (2007). Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China*, 6 (10), 1246-1255.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1998). *Plant physiology* (2<sup>a</sup> ed.). Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- United states department of agriculture: national agricultural library. (s.d.). Obtido em 2011, de Search the USDA national nutrient database for standard reference: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- Varenes, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Lisboa, Portugal: Escolar Editora.
- Veseley, J., Weiss, D. & Stulik, K. (1978). Analysis with ion-selective electrodes. Chichester, United Kingdom: Ellis Horwood.
- Vieira, I., Vasconcelos, E. & Monteiro, A. (1998). Nitrate accumulation, yield and leaf quality of turnip greens in response to nitrogen fertilisation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51, 249-258.
- Walker, R. (1999). The metabolism of dietary nitrites and nitrates. In W. Wilson, A. Ball, & R. Hinton (Eds.), *Managing risks of nitrates to humans and the environment*, 250-258. Cambridge: Royal society of chemistry.
- Wang, H., Inukai, Y. & Yamauchi, A. (2006). Root development and nutrient uptake, critical reviews. *Plant Sciences*, 25 (3), 279-301.
- Weightman, R., Dyer, C., Buxton, J. & Farrington, D. (2006). Effects of light level, time of harvest and position within field on the variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 23 (5), 462-469.
- Weimin, Z., Shijun, L., Lihong, G., Zhongyang, H. & Dabiao, Z. (1998). Genetic diversity of nitrate accumulation in vegetable crops. *Acta Horticulturae*, 467, 119-123.
- WRB. (2006). World reference base for soil resources (2<sup>a</sup> ed.). *World soil resources reports*, 103. FAO, Rome.

## **9.ANEXOS**

## ANEXO I – Ilustração das variedades e linhas de alface

var. *capitata* ('Forlina Rz')



var. *capitata* ('Emocion Rz')



var. *capitata* ('Teide Rz')





*var. capitata* (tipo iceberg)



*var. longifolia*



*var. acephala* ('Kitare Rz')



var. *acephala* ('Ribai Rz')



## ANEXO II – Resultados das análises da água de rega

Parâmetro	Unidade	Água de rega dos ensaios de campo em estufa	Água de rega dos ensaios de campo ao ar livre	Comentários
pH		7,86	7,00	
CE	$\mu\text{S cm}^{-1}$	1104	1658	
Carbonatos	$\text{mg L}^{-1}$	n.d.	n.d.	
Bicarbonatos	$\text{mg L}^{-1}$	5,4	8,7	
Cloretos	$\text{mg L}^{-1}$	99,4	88,8	
N-NO <sub>3</sub>	$\text{mg L}^{-1}$	5,33	26,48	
N-NH <sub>4</sub>	$\text{mg L}^{-1}$	n.d.	n.d.	
Na	$\text{mg L}^{-1}$	65,55	70,80	
Ca	$\text{mg L}^{-1}$	104,25	180,28	
Mg	$\text{mg L}^{-1}$	46,95	50,90	
CSR		-3,70	-4,47	sem problemas
RSA		2,13	1,20	sem problemas



### **ANEXO III – Descrição dos procedimentos adoptados nos ensaios enzimáticos**

#### **EXTRACÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS E RAÍZES DE ALFACES**

- Moer 1 g de material vegetal moído num almofariz com a ajuda de azoto líquido e dividi-lo por dois tubos tipo eppendorf (com 500 µl de tampão de extracção + 2,5 µl de mercaptoetanol previamente arrefecido);
- Centrifugar durante 5 minutos a 15 000 RPM a 4° C;
- Retirar o sobrenadante de cada tubo eppendorf e juntar num tubo só;
- Centrifugar durante 20 minutos a 15 000 RPM a 4°C.
- Retirar sobrenadante para novo tubo e congelar a -20°C

#### **Constituição Do Tampão De Extracção**

- 50 mM Fosfato Monopotássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 7,5;
- 2 mM EDTA;
- 1,5% (p/v) Caseína;
- 2 mM DTT;
- 1% PVP.

#### **DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS (Método de Bradford)**

- 20 µl de amostra + 1 ml de reagente Bradford (previamente diluído 1:5 e filtrado);
- Quantificação por espectrofotometria de absorção molecular (595 nm)

#### **AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENZIMA NITRATO-REDUTASE (método de Kaiser e Lewis)**

1- Conteúdo de cada tubo:

- 50 µl de tampão fosfato pH 7,5
- 50 µl de NADH ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ )
- 100 µl de  $\text{KNO}_3$  (0,1 M)
- 50 µl de extracto
- 750 µl de  $\text{dH}_2\text{O}$

2- Incubar em banho-maria durante 18 horas a 30°C

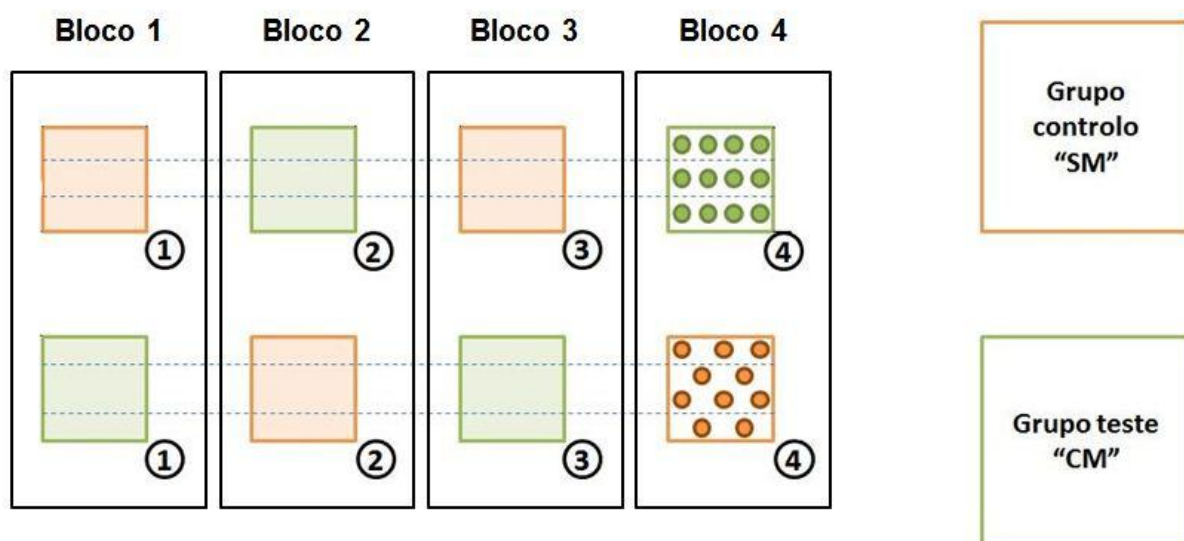
3- Parar a reacção enzimática com:

- 500 µl 1% (p/v) Sulfanilamida em HCl 1,5M + 500 µl de 0,02% (p/v) NED;

4- Centrifugar durante 2-3 minutos a 8000 RPM à temperatura ambiente;

5- Quantificação por espectrofotometria de absorção molecular (540 nm)

**ANEXO IV - Dados estatísticos que fundamentam a afirmação de que o solo não interferiu na acumulação de nitratos nas alfaces dos ensaios de campo.**



		Tests of Normality			Shapiro-Wilk		
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>					
	Blocos	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
<b>1º Ensaio de campo ao ar livre (1ECAL)</b>	Bloco 1	0,260	2 .				
	Bloco 2	0,260	2 .				
	Bloco 3	0,260	2 .				
	Bloco 4	0,260	2 .				
<b>2º Ensaio de campo ao ar livre (2ECAL)</b>	Bloco 1	0,252	4 .		0,918	4	0,524
	Bloco 2	0,195	4 .		0,974	4	0,865
	Bloco 3	0,293	4 .		0,802	4	0,105
	Bloco 4	0,276	4 .		0,942	4	0,665
<b>1º Ensaio de campo em estufa (1ECE)</b>	Bloco 1	0,335	4 .		0,833	4	0,175
	Bloco 2	0,207	4 .		0,938	4	0,644
	Bloco 3	0,310	4 .		0,814	4	0,129
	Bloco 4	0,235	4 .		0,921	4	0,543
<b>2º Ensaio de campo em estufa (2ECE)</b>	Bloco 1	0,192	4 .		0,978	4	0,889
	Bloco 2	0,240	4 .		0,921	4	0,543
	Bloco 3	0,272	4 .		0,948	4	0,702
	Bloco 4	0,245	4 .		0,962	4	0,791

a. Lilliefors Significance Correction

**Kruskal Wallis Test (1ECAL)**

	<b>Produtividade</b>	<b>Teor_de_Nitratos</b>
<b>Chi-Square</b>	3,331	1,787
<b>df</b>	3	3
<b>Asymp. Sig.</b>	0,343	0,618

**Independent Samples Test**

		<b>Levene's Test for Equality of Variances</b>		<b>t-test for Equality of Means</b>						
		<b>F</b>	<b>Sig.</b>	<b>t</b>	<b>df</b>	<b>Sig.</b>	<b>Mean Difference</b>	<b>Std. Error Difference</b>	<b>95% Confidence Interval of the Difference</b>	
									<b>Lower</b>	<b>Upper</b>
<b>2ECAL</b>	(1)	2,748	0,148	- 0,073	6	0,944	- 12,645	173,137	- 436,295	411,005
	(2)			- 0,073	5,066	0,945	- 12,645	173,137	- 455,967	430,677
<b>1ECE</b>	(1)	0,715	0,412	0,486	14	0,634	115,319	237,075	- 393,156	623,794
	(2)			0,486	10,523	0,637	115,319	237,075	- 409,378	640,016
<b>2ECE</b>	(1)	0,008	0,932	- 0,437	6	0,677	- 251,740	575,726	- 1660,491	1157,011
	(2)			- 0,437	5,951	0,677	- 251,740	575,726	- 1663,287	1159,807

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

**ANEXO V - informações relativas aos tratamentos estatísticos aos efeitos do molibdênio na acumulação de nitratos pelas alfices dos ensaios de campo**

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de nitratos acumulados na parte aérea das alfices (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> de matéria verde) dos ensaios de campo*

	1º Ensaio de campo em ar livre (1ECAL)		2º Ensaio de campo em ar livre (2ECAL)		1º Ensaio de campo em estufa (1ECE)				2º Ensaio de campo em estufa (ECE)	
	SM	CM	SM	CM	SM		CM		SM	CM
Resultados das amostras	1198,5	1314,5	1263,7	729,6	3157,1	2689,7	2412,9	3583,7	979,4	1700,7
	1109,3	735,1	1351,6	913,3	3486,5	2984,2	2693,6	3561,0	2332,0	2761,8
	1029,4	1056,4	1192,8	791,7	1593,9	3352,4	2953,2	3536,5	2754,1	1567,8
	1345,8	1360,5	1039,7	593,4	3072,9	2424,8	3077,7	3023,1	1862,6	2540,7
	1056,3	966,3	1455,4	912,6	3117,8	2897,4	2429,6	2545,4	2446,7	1056,3
	1343,7	766,2	978,1	1482,0	2825,1	2632,6	2517,0	3142,3	1246,0	3554,8
	1382,6	722,8	1269,1	1089,1	3001,9	3281,7	2801,0	2631,2	2239,0	2128,8
	1044,6	947,3	825,5	1125,1	2522,5	2405,8	2605,0	2989,0	3094,1	2183,9
<b>Média</b>	1188,8	983,6	1172,0	954,6	2840,4		2968,9		2119,2	2186,8

**Independent Samples Test**

Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
<b>1ECAL</b>	(1)	1,592	0,228	1,995	14	0,066	205,138	102,805	- 15,358	425,633
	(2)			1,995	11,450	0,070	205,138	102,805	- 20,047	430,322
<b>2ECAL</b>	(1)	0,331	0,574	1,772	14	0,098	217,374	122,648	- 45,680	480,427
	(2)			1,772	13,026	0,100	217,374	122,648	- 47,538	482,285
<b>1ECE</b>	(1)	0,087	0,769	- 0,844	30	0,405	- 128,485	152,158	- 439,233	182,263
	(2)			- 0,844	29,199	0,405	- 128,485	152,158	- 439,590	182,620
<b>2ECE</b>	(1)	0,001	0,976	- 0,180	14	0,860	- 67,593	375,024	- 871,940	736,755
	(2)			- 0,180	13,924	0,860	- 67,593	375,024	- 872,350	737,165

- (1) Equal variances assumed;  
(2) Equal variances not assumed.

Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso seco (g) das alfaces dos ensaios de campo

	1º Ensaio de campo em ar livre (1ECAL)		2º Ensaio de campo em ar livre (2ECAL)		1º Ensaio de campo em estufa (1ECE)		2º Ensaio de campo em estufa (ECE)	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
Resultados das amostras	19,34	15,25	24,68	25,25	16,03	15,20	30,18	28,86
			23,61	13,89	14,11	16,63	21,26	25,26
	14,51	18,66	23,31	21,24	17,14	17,82	27,97	25,78
			23,51	17,94	12,51	17,34	23,22	26,16
	15,27	13,10	21,51	19,71	15,34	18,58	27,43	29,25
			23,83	20,98	16,71	19,94	31,59	28,97
	13,49	15,16	23,20	29,54	14,18	18,62	26,54	21,52
			25,11	24,44	19,34	14,81	27,64	33,10
Média	15,65	15,54	23,60	21,62	15,67	17,37	26,98	27,36

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1ECAL	(1)	0,080	0,787	0,063	6,000	0,951	0,109	1,724	-4,110	4,329
	(2)			0,063	5,932	0,951	0,109	1,724	-4,122	4,341
2ECAL	(1)	7,433	0,016	1,134	14,000	0,276	1,972	1,740	-1,759	5,703
	(2)			1,134	7,702	0,291	1,972	1,740	-2,066	6,011
1ECE	(1)	0,233	0,637	-1,744	14,000	0,103	-1,699	0,975	-3,790	0,391
	(2)			-1,744	13,522	0,104	-1,699	0,975	-3,797	0,398
2ECE	(1)	0,040	0,843	-0,224	14,000	0,826	-0,384	1,711	-4,055	3,286
	(2)			-0,224	13,993	0,826	-0,384	1,711	-4,055	3,286

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso fresco (g) das alfaces dos ensaios de campo

1º Ensaio de campo em ar livre (1ECAL)			2º Ensaio de campo em ar livre (2ECAL)		1º Ensaio de campo em estufa (1ECE)		2º Ensaio de campo em estufa (ECE)	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
Resultados das amostras	484,15	406,90	600,60	691,90	365,89	332,63	711,49	668,61
			595,50	384,50	336,71	402,74	525,00	583,83
	389,08	456,75	557,20	659,30	351,96	407,79	674,64	689,03
			594,30	507,90	394,51	349,53	582,66	585,42
	393,08	341,80	548,60	473,90	330,61	402,09	560,55	788,48
			612,90	507,40	366,38	397,96	772,20	674,28
	343,52	392,65	615,80	603,60	280,72	402,95	629,43	556,74
			634,90	708,40	392,22	354,37	663,65	751,06
Média	414,85	399,53	594,98	567,11	352,38	381,26	639,95	662,18

### Mann-Whitney Test

	1º Ensaio de campo em ar livre	1º Ensaio de campo em estufa
Mann-Whitney U	7,000	15,000
Wilcoxon W	17,000	51,000
Z	-0,290	-1,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,772	0,074

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
2ECAL	(1)	17,770	0,001	0,658	14	0,521	27,863	42,349	- 62,966	118,691
	(2)			0,658	7,880	0,529	27,863	42,349	- 70,054	125,779
2ECE	(1)	0,000	0,986	-0,539	14	0,598	- 22,229	41,229	- 110,657	66,199
	(2)			-0,539	13,999	0,598	- 22,229	41,229	- 110,657	66,200

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de elementos (%) presentes na parte aérea das alfaves dos ensaios de campo.

		Macronutrientes (%)					Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
1ECAL	SM	3,91	0,34	4,84	0,69	0,35	498,48	15,62	43,04	65,93
		4,16	0,32	4,72	0,82	0,39	403,3	16,14	39,51	66,18
		4,15	0,32	5,12	0,8	0,38	482,1	15,72	48,59	74,31
		4,27	0,33	4,92	0,73	0,34	423,1	20,08	38,46	72,48
	CM	3,65	0,31	4,45	0,6	0,32	428,2	21,87	40,91	49,75
		4,06	0,32	4,98	0,66	0,35	699,26	17,79	42,09	63,41
		3,9	0,34	4,98	0,76	0,36	606,46	19,18	43,25	74,75
		4,11	0,31	4,98	0,87	0,36	637,97	10,39	34,85	77,31
2ECAL	SM	3,81	0,29	5,57	1,40	0,49	965,69	11,44	48,61	48,28
		4,10	0,31	5,63	1,57	0,50	614,59	11,78	44,19	41,15
		3,88	0,31	5,99	1,45	0,46	620,82	12,21	50,35	41,43
		3,71	0,28	5,90	1,68	0,43	892,02	25,78	87,91	53,22
		4,05	0,30	5,65	1,60	0,49	626,55	11,60	70,08	38,15
		3,63	0,31	5,99	1,44	0,42	696,13	15,89	57,05	34,50
		3,67	0,30	5,31	1,27	0,37	320,50	10,94	38,40	27,16
		3,46	0,28	5,42	1,36	0,38	292,40	6,82	44,62	30,70

		Macronutrientes (%)					Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
2ECAL	CM	3,61	0,29	5,38	1,36	0,42	1188,59	15,22	57,29	53,26
		4,20	0,34	6,17	1,39	0,49	577,23	11,67	52,25	41,20
		4,17	0,34	5,31	1,35	0,43	620,88	11,59	56,06	37,24
		4,14	0,35	5,36	1,07	0,37	599,63	11,64	53,79	37,18
		3,44	0,31	5,27	1,35	0,41	983,83	12,07	67,00	46,59
		3,97	0,31	5,66	1,50	0,47	862,37	11,73	42,40	42,40
		3,61	0,26	4,02	0,98	0,32	624,23	8,54	45,86	33,37
		3,92	0,30	5,04	1,22	0,37	1040,40	10,42	50,94	31,27
1ECE	SM	4,91	0,67	9,67	-	-	-	-	-	-
		5,11	0,70	10,12	-	-	-	-	-	-
		4,98	0,44	7,42	-	-	-	-	-	-
		4,76	0,58	9,5	-	-	-	-	-	-
		4,76	0,39	7,77	-	-	-	-	-	-
		4,91	0,54	9,43	-	-	-	-	-	-
		4,87	0,33	7,67	-	-	-	-	-	-
		4,81	0,56	8,87	-	-	-	-	-	-
	CM	4,56	0,61	8,91	-	-	-	-	-	-
		4,99	0,72	10,11	-	-	-	-	-	-
		4,58	0,50	9,06	-	-	-	-	-	-
		5,07	0,63	8,44	-	-	-	-	-	-
		5,31	0,66	9,68	-	-	-	-	-	-
		5,14	0,58	9,72	-	-	-	-	-	-
		4,79	0,65	9,29	-	-	-	-	-	-
		4,61	0,62	9,5	-	-	-	-	-	-
2ECE	SM	3,51	-	8,64	1,51	0,36	158,37	22,41	41,98	47,81
		3,83	-	7,07	1,69	0,40	128,26	13,42	47,13	56,67
		4,81	-	9,20	1,25	0,33	118,35	10,49	33,71	50,94
		3,74	-	9,36	1,45	0,38	124,37	12,28	30,86	58,34
		3,73	-	6,38	0,93	0,23	126,60	15,38	72,53	37,86
		3,44	-	8,41	1,36	0,34	299,12	11,42	37,10	39,96
		3,95	-	8,79	1,14	0,31	146,62	9,87	32,00	39,48
		3,44	-	8,34	1,33	0,34	148,53	10,80	36,19	41,86
	CM	3,44	-	8,13	1,43	0,33	361,99	11,01	28,13	47,69
		3,76	-	8,30	1,24	0,31	175,70	12,16	49,06	41,90
		3,53	--	8,46	1,40	0,33	132,39	9,55	42,31	43,67
		3,21	-	7,30	1,09	0,26	103,84	8,74	34,10	40,44
		4,17	-	9,08	1,21	0,32	133,60	19,84	48,54	47,62
		3,81	-	8,68	1,50	0,38	155,27	9,13	38,06	59,37
		4,02	-	9,15	1,62	0,39	190,46	13,90	48,24	54,22
		3,39	-	7,39	1,11	0,26	123,72	9,68	35,18	38,73

- Tratamento estatístico relativo ao teor de elementos presentes na parte aérea das alfaces do 1º ensaio de campo em ar livre.

Mann-Whitney Test						
	Comparação entre modalidades	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
K (%)	SM Vs CM	7,000	17,000	- 0,296	0,767	0,886 <sup>a</sup>
Cu (ppm)	SM Vs CM	6,000	16,000	- 0,577	0,564	0,686 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

Independent Samples Test										
Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nkj (%)	(1)	0,505	0,504	1,500	6	0,184	0,193	0,128	- 0,122	0,507
	(2)			1,500	5,501	0,189	0,193	0,128	- 0,129	0,514
P (%)	(1)	0,300	0,604	,878	6	0,414	0,008	0,009	- 0,013	0,028
	(2)			,878	5,273	0,418	0,008	0,009	- 0,014	0,029
Ca (%)	(1)	2,449	0,169	,564	6	0,593	0,038	0,067	- 0,125	0,200
	(2)			,564	4,468	0,600	0,038	0,067	- 0,140	0,215
Mg (%)	(1)	1,119	0,331	1,151	6	0,294	0,018	0,015	- 0,020	0,055
	(2)			1,151	5,710	0,296	0,018	0,015	- 0,020	0,055
Fe (ppm)	(1)	1,667	0,244	- 2,258	6	0,065	- 141,228	62,534	-294,244	11,789
	(2)			- 2,258	3,904	0,088	- 141,228	62,534	-316,542	34,087
Cu (ppm)	(1)	1,483	0,269	-,156	6	0,881	- 0,418	2,679	- 6,973	6,138
	(2)			-,156	4,098	0,884	- 0,418	2,679	- 7,786	6,951

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

- Tratamento estatístico relativo ao teor de elementos presentes na parte aérea das alfaces do 2º ensaio de campo em ar livre.

Mann-Whitney Test						
	Comparação entre modalidades	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
Cu (ppm)	SM Vs CM	28,000	64,000	- 0,420	0,674	0,721 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.



### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nkj (%)	(1)	1,536	0,236	- 0,727	14	0,479	- 0,094	0,129	- 0,370	0,183
	(2)			- 0,727	12,871	0,480	- 0,094	0,129	- 0,373	0,185
P (%)	(1)	3,774	0,072	- 1,296	14	0,216	- 0,015	0,012	- 0,040	0,010
	(2)			- 1,296	9,455	0,226	- 0,015	0,012	- 0,041	0,011
K (%)	(1)	0,977	0,340	1,738	14	0,104	0,406	0,234	- 0,095	0,908
	(2)			1,738	9,405	0,115	0,406	0,234	- 0,119	0,932
Ca (%)	(1)	0,618	0,445	2,473	14	<b>0,027</b>	0,194	0,078	0,026	0,362
	(2)			2,473	13,192	0,028	0,194	0,078	0,025	0,363
Mg (%)	(1)	0,000	1,000	1,220	14	0,243	0,033	0,027	- 0,025	0,090
	(2)			1,220	13,870	0,243	0,033	0,027	- 0,025	0,090
Fe (ppm)	(1)	0,384	0,545	- 1,542	14	0,145	- 183,558	119,062	- 438,921	71,806
	(2)			- 1,542	14,000	0,145	- 183,558	119,062	- 438,921	71,806
Zn (ppm)	(1)	3,437	0,085	0,307	14	0,764	1,953	6,366	- 11,701	15,606
	(2)			0,307	9,803	0,765	1,953	6,366	- 12,270	16,175
Mn (ppm)	(1)	0,259	0,619	- 0,248	14	0,807	- 0,990	3,985	- 9,538	7,558
	(2)			- 0,248	13,525	0,808	- 0,990	3,985	- 9,566	7,586

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

- Tratamento estatístico relativo ao teor de elementos presentes na parte aérea das alfaces do 1º ensaio de campo em estufa.

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Nkj (%)	(1)	11,216	<b>0,005</b>	0,068	14	0,946	0,008	0,110	- 0,227	0,242
	(2)			0,068	9,320	0,947	0,008	0,110	- 0,239	0,254
P (%)	(1)	4,592	<b>0,050</b>	- 1,846	14	0,086	- 0,095	0,051	- 0,205	0,015
	(2)			- 1,846	10,176	0,094	- 0,095	0,051	- 0,209	0,019
K (%)	(1)	6,728	<b>0,021</b>	- 1,287	14	0,219	- 0,533	0,413	- 1,420	0,355
	(2)			- 1,287	10,364	0,226	- 0,533	0,413	- 1,450	0,385

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

- Tratamento estatístico relativo ao teor de elementos presentes na parte aérea das alfaces do 2º ensaio de campo em estufa.

Mann-Whitney Test						
Comparação entre modalidades	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	
<b>Fe</b> SM Vs CM	27,000	63,000	- 0,525	0,600	0,645 <sup>a</sup>	

a. Not corrected for ties.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances			t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
<b>Nkj (%)</b>	(1)	0,023	0,881	0,713	14	0,487	0,140	0,197	- 0,281	0,561
	(2)			0,713	12,892	0,488	0,140	0,197	- 0,284	0,564
<b>K (%)</b>	(1)	0,871	0,366	- 0,085	14	0,933	- 0,038	0,440	- 0,982	0,907
	(2)			- 0,085	12,222	0,933	- 0,038	0,440	- 0,995	0,920
<b>Ca (%)</b>	(1)	0,016	0,900	0,070	14	0,945	0,008	0,107	- 0,221	0,236
	(2)			0,070	13,491	0,945	0,008	0,107	- 0,222	0,237
<b>Mg (%)</b>	(1)	0,000	0,985	0,554	14	0,589	0,014	0,025	- 0,040	0,067
	(2)			0,554	13,919	0,589	0,014	0,025	- 0,040	0,067
<b>Cu (ppm)</b>	(1)	0,024	0,880	0,772	14	0,453	1,508	1,953	-2,681	5,697
	(2)			0,772	13,854	0,453	1,508	1,953	-2,686	5,701
<b>Zn (ppm))</b>	(1)	0,610	0,448	0,177	14	0,862	0,985	5,567	-10,956	12,926
	(2)			0,177	11,152	0,863	0,985	5,567	-11,248	13,218
<b>Mn (ppm)</b>	(1)	0,500	0,491	- 0,024	14	0,981	- 0,090	3,796	-8,232	8,052
	(2)			- 0,024	13,791	0,981	- 0,090	3,796	-8,244	8,064

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de elementos (%) presentes na parte aérea das alfaves dos ensaios de campo.

		Macronutrientes (kg ha <sup>-1</sup> )					Micronutrientes (g ha <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
1ECAL	SM	90,87	8,01	112,48	16,04	8,13	1158,43	36,30	100,02	153,22
		72,45	5,55	82,20	14,28	6,79	702,36	28,11	68,81	115,25
		75,95	5,91	93,71	14,64	6,95	882,33	28,77	88,93	136,00
		69,17	5,37	79,70	11,83	5,51	685,43	32,53	62,31	117,42
	CM	66,83	5,75	81,48	10,99	5,86	784,06	40,05	74,91	91,09
		91,01	7,24	111,64	14,80	7,85	1567,55	39,88	94,35	142,15
		61,27	5,42	78,23	11,94	5,66	952,70	30,13	67,94	117,43
		74,75	5,56	90,57	15,82	6,55	1160,31	18,90	63,38	140,61
2ECAL	SM	112,88	8,55	165,12	41,50	14,48	2860,39	33,88	143,99	142,99
		116,04	8,88	159,40	44,60	14,16	1741,09	33,36	125,18	116,57
		108,41	8,74	167,47	40,65	12,99	1736,45	34,14	140,82	115,87
		104,67	8,00	166,53	47,43	12,20	2517,09	72,74	248,06	150,17
		104,66	7,82	145,96	41,32	12,70	1617,54	29,94	180,93	98,49
		103,93	8,84	171,19	41,10	12,06	1990,62	45,44	163,14	98,67
		102,16	8,22	147,69	35,36	10,31	892,10	30,46	106,87	75,59
		104,24	8,50	163,36	40,89	11,40	880,95	20,55	134,42	92,49
2ECAL	CM	109,25	8,93	163,02	41,15	12,73	3600,79	46,10	173,56	161,34
		70,05	5,63	102,76	23,22	8,17	961,97	19,44	87,08	68,65
		106,34	8,70	135,24	34,52	10,84	1582,35	29,53	142,86	94,91
		89,06	7,54	115,39	23,10	7,95	1291,16	25,06	115,82	80,07
		81,39	7,38	124,65	31,91	9,68	2327,02	28,54	158,47	110,20
		99,88	7,73	142,41	37,64	11,74	2171,04	29,52	106,75	106,75
		128,05	9,20	142,41	34,89	11,33	2212,95	30,28	162,59	118,30
		115,06	8,75	147,67	35,91	10,83	3050,86	30,56	149,38	91,69
1ECE	SM	78,69	10,77	154,97	-	-	-	-	-	-
		72,09	9,91	142,77	-	-	-	-	-	-
		85,36	7,56	127,18	-	-	-	-	-	-
		59,53	7,31	118,81	-	-	-	-	-	-
		73,02	6,03	119,19	-	-	-	-	-	-
		82,03	9,04	157,55	-	-	-	-	-	-
		69,04	4,64	108,73	-	-	-	-	-	-
		93,01	10,80	171,51	-	-	-	-	-	-
	CM	69,32	9,22	135,44	-	-	-	-	-	-
		83,00	12,05	168,16	-	-	-	-	-	-
		81,62	8,94	161,45	-	-	-	-	-	-
		87,90	10,97	146,32	-	-	-	-	-	-
		98,64	12,24	179,82	-	-	-	-	-	-
		102,48	11,57	193,80	-	-	-	-	-	-
		89,17	12,11	172,95	-	-	-	-	-	-
		68,29	9,25	140,72	-	-	-	-	-	-

		Macronutrientes (kg ha <sup>-1</sup> )					Micronutrientes (g ha <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
2ECE	SM	105,89	-	260,75	45,64	10,94	477,77	67,61	126,65	144,23
		81,44	-	150,25	35,99	8,59	272,72	28,54	100,21	120,50
		134,67	-	257,54	35,13	9,21	331,36	29,36	94,37	142,61
		86,95	-	217,70	33,82	8,90	289,13	28,56	71,75	135,64
		102,24	-	174,84	25,62	6,32	347,01	42,16	198,80	103,78
		108,65	-	265,49	43,09	10,83	944,71	36,06	117,19	126,20
		104,92	-	233,56	30,33	8,36	389,46	26,21	85,01	104,85
		94,97	-	230,15	36,72	9,27	410,05	29,82	99,90	115,56
	CM	99,36	-	234,83	41,24	9,55	1045,57	31,79	81,24	137,76
		95,05	-	209,92	31,43	7,82	444,17	30,75	124,02	105,92
		90,97	-	218,06	36,14	8,53	341,16	24,62	109,03	112,55
		84,00	-	191,12	28,60	6,91	271,72	22,88	89,24	105,83
		121,98	-	265,52	35,50	9,37	390,81	58,04	142,01	139,30
		110,47	-	251,58	43,37	11,10	450,20	26,48	110,34	172,14
		86,39	-	196,74	34,73	8,37	409,31	29,88	103,67	116,52
		112,28	-	244,77	36,88	8,57	409,79	32,07	116,52	128,28

- Tratamento estatístico relativo à exportação de nutrientes pela parte aérea das alfaces do 1º ensaio de campo ao ar livre.

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
N	(1)	0,330	0,587	0,453	6,000	0,667	3,645	8,050	-16,053	23,343
	(2)			0,453	5,530	0,668	3,645	8,050	-16,466	23,756
P	(1)	0,507	0,503	0,293	6,000	0,779	0,218	0,742	-1,597	2,032
	(2)			0,293	5,330	0,780	0,218	0,742	-1,654	2,089
K	(1)	0,006	0,941	0,146	6,000	0,889	1,542	10,601	-24,396	27,481
	(2)			0,146	6,000	0,889	1,542	10,601	-24,397	27,482
Ca	(1)	1,433	0,276	0,562	6,000	0,595	0,810	1,442	-2,719	4,339
	(2)			0,562	5,613	0,596	0,810	1,442	-2,779	4,399
Mg	(1)	0,003	0,957	0,500	6,000	0,635	0,365	0,730	-1,420	2,150
	(2)			0,500	5,962	0,635	0,365	0,730	-1,423	2,153
Fe	(1)	0,633	0,456	-1,285	6,000	0,246	-259,018	201,569	-752,240	234,205
	(2)			-1,285	5,152	0,254	-259,018	201,569	-772,615	254,580

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

Independent Samples Test										
Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means						
				t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.						Lower	Upper
Cu	(1)	3,826	0,098	-0,152	6,000	0,884	-0,813	5,360	-13,929	12,304
	(2)			-0,152	3,838	0,887	-0,813	5,360	-15,946	14,321
Zn	(1)	1,036	0,348	0,439	6,000	0,676	4,873	11,098	-22,283	32,028
	(2)			0,439	5,665	0,677	4,873	11,098	-22,677	32,422
Mn	(1)	0,471	0,518	0,512	6,000	0,627	7,652	14,933	-28,888	44,193
	(2)			0,512	5,535	0,628	7,652	14,933	-29,646	44,951
(1) Equal variances assumed;										
(2) Equal variances not assumed.										

- Tratamento estatístico relativo à exportação de nutrientes pela parte aérea das alfaces do 2º ensaio de campo ao ar livre.

Test Statistics <sup>b</sup>					
	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
<b>Cu</b>	16,000	52,000	-1,680	0,093	0,105 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Modalidade

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
N	(1)	8,221	<b>0,012</b>	1,048	14,000	0,312	7,239	6,907	-7,576	22,053
	(2)			1,048	7,944	0,325	7,239	6,907	-8,709	23,187
P	(1)	6,026	<b>0,028</b>	1,054	14,000	0,310	0,461	0,438	-0,477	1,400
	(2)			1,054	8,557	0,321	0,461	0,438	-0,537	1,459
K	(1)	3,333	0,089	3,533	14,000	<b>0,003</b>	26,646	7,543	10,469	42,824
	(2)			3,533	10,108	0,005	26,646	7,543	9,864	43,428
Ca	(1)	3,241	0,093	3,381	14,000	<b>0,004</b>	8,814	2,607	3,223	14,404
	(2)			3,381	10,656	0,006	8,814	2,607	3,054	14,573

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
<b>Mg</b>	(1)	0,558	0,467	2,765	14,000	<b>0,015</b>	2,129	0,770	0,477	3,780
	(2)			2,765	13,448	0,016	2,129	0,770	0,471	3,786
<b>Fe</b>	(1)	0,359	0,559	-0,934	14,000	0,366	-370,239	396,518	-1220,686	480,208
	(2)			-0,934	13,285	0,367	-370,239	396,518	-1224,997	484,520
<b>Zn</b>	(1)	0,306	0,589	0,975	14,000	0,346	18,363	18,825	-22,012	58,737
	(2)			0,975	12,508	0,348	18,363	18,825	-22,469	59,194
<b>Mn</b>	(1)	0,000	0,989	0,548	14,000	0,592	7,366	13,437	-21,454	36,186
	(2)			0,548	13,843	0,592	7,366	13,437	-21,484	36,217

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

- Tratamento estatístico relativo à exportação de nutrientes pela parte aérea das alfaces do 1º ensaio de campo em estufa.

### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
<b>N</b>	(1)	0,173	0,684	-1,484	14,000	0,160	-8,456	5,700	-20,682	3,769
	(2)			-1,484	13,638	0,161	-8,456	5,700	-20,712	3,800
<b>P</b>	(1)	2,343	0,148	-2,687	14,000	<b>0,018</b>	-2,536	0,944	-4,561	-0,512
	(2)			-2,687	11,855	0,020	-2,536	0,944	-4,595	-0,477
<b>K</b>	(1)	0,319	0,581	-2,314	14,000	<b>0,036</b>	-24,744	10,691	-47,674	-1,814
	(2)			-2,314	13,870	0,036	-24,744	10,691	-47,694	-1,794

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

- Tratamento estatístico relativo à exportação de nutrientes pela parte aérea das alfaces do 2º ensaio de campo em estufa.

Test Statistics <sup>b</sup>					
	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
<b>Fe</b>	26,000	62,000	-0,630	0,529	0,574 <sup>a</sup>
<b>Cu</b>	28,000	64,000	-0,420	0,674	0,721 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Modalidade

Independent Samples Test										
Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
N	(1)	0,000	0,988	0,322	14,000	0,752	2,404	7,468	-13,614	18,421
	(2)			0,322	13,592	0,752	2,404	7,468	-13,659	18,467
K	(1)	1,037	0,326	-0,158	14,000	0,876	-2,782	17,556	-40,436	34,871
	(2)			-0,158	11,933	0,877	-2,782	17,556	-41,057	35,492
Ca	(1)	0,391	0,542	-0,068	14,000	0,946	-0,194	2,831	-6,266	5,878
	(2)			-0,068	12,936	0,946	-0,194	2,831	-6,313	5,926
Mg	(1)	0,039	0,845	0,404	14,000	0,693	0,275	0,681	-1,186	1,736
	(2)			0,404	13,682	0,693	0,275	0,681	-1,189	1,739
Zn	(1)	1,611	0,225	0,145	14,000	0,887	2,226	15,400	-30,804	35,256
	(2)			0,145	10,164	0,888	2,226	15,400	-32,012	36,465
Mn	(1)	0,589	0,456	-0,321	14,000	0,753	-3,116	9,702	-23,926	17,693
	(2)			-0,321	12,593	0,753	-3,116	9,702	-24,146	17,913

(1) Equal variances assumed;

(2) Equal variances not assumed.

**ANEXO VI - informações relativas aos tratamentos estatísticos ao estudo da acumulação de nitratos nas diferentes variedade e/ou linhas de alfaces**

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de nitratos acumulados na parte aérea (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> de matéria verde)*

		<b>'Forlina Rz' (1)</b>	<b>'Kitare Rz' (2)</b>	<b>'Ribai Rz' (3)</b>	<b>'Teide Rz' (4)</b>	<b>'Emocion Rz' (5)</b>
<b>1º Ensaio de campo</b>		1781,94	1075,69	1717,74	1640,88	1198,48
		1670,11	1417,78	1630,84	1307,30	1109,34
		1762,25	1748,24	1920,79	1642,11	1029,35
		1844,53	1409,28	1548,73	1426,96	1345,76
	Média	1764,70	1412,75	1704,53	1504,31	1188,77
<b>2º Ensaio de campo</b>		1818,00	1413,27	2566,39	1307,57	1263,72
		1627,21	1594,84	2134,89	1244,14	1351,56
		1424,90	1559,25	2100,43	1085,64	1192,76
		1409,54	1408,42	1909,68	1575,66	1039,71
	Média	1569,91	1493,95	2177,85	1303,25	1171,97

**ANOVA**

		<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>1º Ensaio de campo em ar livre</b>	Between Groups	1215858,042	4	303964,510	10,363	<b>0,000</b>
	Within Groups	557296,558	19	29331,398		
	Total	1773154,600	23			
<b>2º Ensaio de Campo em ar livre</b>	Between Groups	2865045,201	4	716261,300	16,977	<b>0,000</b>
	Within Groups	801632,091	19	42191,163		
	Total	3666677,292	23			

<b>Teste de comparações múltiplas Scheffe (1º Ensaio de campo)</b>					<b>Teste de comparações múltiplas Scheffe (2º Ensaio de campo)</b>				
<b>Variedade/linha</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Variedade/linha</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	0,119				<b>2</b>	0,991			
<b>3</b>	0,992	0,256			<b>3</b>	<b>0,011</b>	<b>0,004</b>		
<b>4</b>	0,361	0,964	0,612		<b>4</b>	0,515	0,785	<b>0,000</b>	
<b>5</b>	<b>0,001</b>	0,368	<b>0,003</b>	0,100	<b>5</b>	0,077	0,206	<b>0,000</b>	0,892



Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso seco (g).

		'Forlina Rz' (1)	'Kitare Rz' (2)	'Ribai Rz' (3)	'Teide Rz' (4)	'Emocion Rz' (5)
2º Ensaio de campo		16,29	12,57	10,81	11,96	24,68
		14,02	17,51	12,35	11,14	23,61
		17,30	14,14	11,77	14,44	23,31
		14,57	20,88	16,50	10,91	23,51
	Média	15,55	16,28	12,86	12,11	23,60

#### Kruskal Wallis Test

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
2º Ensaio de campo	18,290	4,000	0,001

#### Mann-Whitney Test

Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,773			
3	0,149	0,083		
4	0,043	0,083	0,773	
5	0,007	0,007	0,007	0,007

Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso fresco (g).

		'Forlina Rz' (1)	'Kitare Rz' (2)	'Ribai Rz' (3)	'Teide Rz' (4)	'Emocion Rz' (5)
2º Ensaio de campo		430,05	292,88	251,82	321,80	600,6
		385,00	451,56	324,93	321,30	595,5
		524,30	354,46	332,57	405,41	557,2
		397,60	492,88	390,72	331,57	594,3
	Média	434,24	397,95	325,01	345,02	594,98

#### Kruskal Wallis Test

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Peso fresco	17,620	4	0,001

Mann-Whitney Test				
Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,564			
3	<b>0,043</b>	0,248		
4	0,083	0,386	1,000	
5	<b>0,011</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de elementos presentes na parte aérea das diversas variedades e/ou linhas de alfaces estudadas*

	Macronutrientes (%)					Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
'Forlina Rz' (1)	3,45	0,37	6,75	1,64	0,56	754,75	13,67	55,65	69,11
	4,20	0,38	7,80	1,75	0,57	887,82	14,52	58,22	72,37
	4,40	0,39	7,52	1,56	0,50	798,87	20,77	56,42	49,81
	4,19	0,33	6,64	1,35	0,53	893,66	18,87	50,38	58,10
'Kitare Rz' (2)	3,44	0,31	6,67	1,45	0,42	1826,05	16,85	65,92	85,57
	3,66	0,31	5,73	1,43	0,43	2229,80	15,30	80,00	95,80
	3,81	0,33	6,69	1,30	0,42	1972,48	30,85	61,88	108,76
	4,61	0,30	6,87	1,24	0,42	1412,93	16,26	50,11	66,64
'Ribai Rz' (3)	3,97	0,28	7,54	1,55	0,50	2380,25	19,25	66,60	181,63
	3,72	0,33	7,51	1,60	0,46	1889,96	20,44	64,63	99,68
	4,32	0,32	7,96	1,46	0,52	1145,58	17,53	54,37	64,29
	3,40	0,30	4,85	0,89	0,34	2770,64	24,56	74,27	113,08
'Teide Rz' (4)	3,65	0,31	8,58	1,69	0,53	1485,32	17,47	53,99	114,56
	3,56	0,24	7,39	1,43	0,47	1518,77	18,43	44,00	68,13
	3,25	0,28	7,14	1,22	0,52	2000,43	30,46	75,21	77,38
	3,80	0,27	6,78	1,16	0,48	528,99	16,52	40,52	37,72
'Emocion Rz' (5)	3,81	0,29	5,57	1,40	0,49	965,69	11,44	48,61	48,28
	4,10	0,31	5,63	1,57	0,50	614,59	11,78	44,19	41,15
	3,88	0,31	5,99	1,45	0,46	620,82	12,21	50,35	41,43
	3,71	0,28	5,90	1,68	0,43	892,02	25,78	87,91	53,22
	4,05	0,30	5,65	1,60	0,49	626,55	11,60	70,08	38,15
	3,63	0,31	5,99	1,44	0,42	696,13	15,89	57,05	34,50
	3,67	0,30	5,31	1,27	0,37	320,50	10,94	38,40	27,16
	3,46	0,28	5,42	1,36	0,38	292,40	6,82	44,62	30,70

Kruskal Wallis Test			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
K	12,353	4	0,015
Mg	12,329	4	0,015
Cu	9,558	4	0,049

Mann-Whitney Test (K)					Mann-Whitney Test (Mg)				
Variedade/linha	1	2	3	4	Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,248				2	<b>0,018</b>			
3	0,773	0,248			3	0,059	0,237		
4	0,564	<b>0,043</b>	0,773		4	0,110	<b>0,018</b>	0,309	
5	<b>0,006</b>	<b>0,027</b>	0,173	<b>0,006</b>	5	<b>0,008</b>	0,386	0,495	0,089

Mann-Whitney Test (Cu)				
Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,564			
3	0,248	0,248		
4	0,564	0,386	0,386	
5	0,089	<b>0,042</b>	<b>0,042</b>	<b>0,027</b>

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>N</b>	Between Groups	0,517	4	0,129	1,092	0,389
	Within Groups	2,248	19	0,118		
	Total	2,765	23			
<b>P</b>	Between Groups	0,019	4	0,005	12,019	<b>0,000</b>
	Within Groups	0,008	19	0,000		
	Total	0,027	23			
<b>Ca</b>	Between Groups	0,143	4	0,036	0,917	0,475
	Within Groups	0,742	19	0,039		
	Total	0,885	23			
<b>Na</b>	Between Groups	0,024	4	0,006	1,464	0,252
	Within Groups	0,077	19	0,004		
	Total	0,101	23			
<b>Fe</b>	Between Groups	7872230	4	1968057,446	11,091	<b>0,000</b>
	Within Groups	3371580	19	177451,561		
	Total	1,12E+07	23			
<b>Zn</b>	Between Groups	542,492	4	135,623	0,781	0,551
	Within Groups	3299,247	19	173,645		
	Total	3841,739	23			
<b>Mn</b>	Between Groups	17296,34	4	4324,086	6,816	<b>0,001</b>
	Within Groups	12053,21	19	634,379		
	Total	29349,55	23			

Multiple Comparisons - Scheffe (P)					Multiple Comparisons - Scheffe (Fe)				
Variedade/linha	1	2	3	4	Variedade/linha	1	2	3	4
2	<b>0,021</b>				2	<b>0,046</b>			
3	<b>0,010</b>	0,998			3	<b>0,014</b>	0,982		
4	<b>0,000</b>	0,183	0,303		4	0,511	0,640	0,328	
5	<b>0,001</b>	0,826	0,954	0,519	5	0,957	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,115

Multiple Comparisons - Scheffe (Mn)				
Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,689			
3	0,113	0,728		
4	0,975	0,950	0,314	
5	0,696	0,068	<b>0,003</b>	0,307

Resultados e tratamento estatístico relativo às exportações da parte aérea das diversas variedades e/ou linhas de alfaces estudadas

	Macronutrientes (kg ha <sup>-1</sup> )					Micronutrientes (g ha <sup>-1</sup> )			
	Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
<b>'Forlina Rz'</b> <b>(1)</b>	67,41	7,32	132,04	32,12	10,86	1475,37	26,73	108,78	135,09
	70,62	6,36	131,28	29,37	9,58	1493,78	24,44	97,96	121,76
	91,37	8,19	156,12	32,43	10,32	1658,70	43,13	117,15	103,42
	73,26	5,73	116,04	23,66	9,29	1562,33	32,98	88,08	101,57
<b>'Kitare Rz'</b> <b>(2)</b>	51,85	4,60	100,70	21,91	6,27	2754,85	25,42	99,45	129,10
	76,98	6,51	120,32	30,00	8,93	4684,58	32,14	168,07	201,27
	64,74	5,66	113,56	22,06	7,12	3348,00	52,36	105,02	184,61
	115,59	7,40	171,98	31,14	10,41	3539,61	40,74	125,54	166,94
<b>'Ribai Rz'</b> <b>(3)</b>	51,44	3,57	97,79	20,11	6,54	3087,76	24,97	86,40	235,62
	55,17	4,93	111,29	23,70	6,80	2801,83	30,31	95,82	147,77
	61,04	4,49	112,35	20,61	7,38	1617,54	24,76	76,77	90,78
	67,31	5,90	96,02	17,63	6,79	5486,86	48,65	147,09	223,94
<b>'Teide Rz'</b> <b>(4)</b>	52,42	4,46	123,06	24,30	7,58	2131,52	25,07	77,48	164,41
	47,59	3,15	98,72	19,09	6,26	2029,44	24,63	58,80	91,03
	56,30	4,86	123,71	21,22	9,04	3467,31	52,80	130,37	134,12
	49,74	3,48	88,77	15,21	6,23	692,32	21,62	53,04	49,36
<b>'Emocion Rz'</b> <b>(5)</b>	112,88	8,55	165,12	41,50	14,48	2860,39	33,88	143,99	142,99
	116,04	8,88	159,40	44,60	14,16	1741,09	33,36	125,18	116,57
	108,41	8,74	167,47	40,65	12,99	1736,45	34,14	140,82	115,87
	104,67	8,00	166,53	47,43	12,20	2517,09	72,74	248,06	150,17
	104,66	7,82	145,96	41,32	12,70	1617,54	29,94	180,93	98,49
	103,93	8,84	171,19	41,10	12,06	1990,62	45,44	163,14	98,67
	102,16	8,22	147,69	35,36	10,31	892,10	30,46	106,87	75,59
	104,24	8,50	163,36	40,89	11,40	880,95	20,55	134,42	92,49

#### Kruskal Wallis Test

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
<b>N</b>	16,898	4,000	<b>0,002</b>
<b>Cu</b>	2,518	4,000	0,642
<b>Mn</b>	7,288	4,000	0,121

#### Mann-Whitney Test (N)

Variedade/linha	1	2	3	4
<b>2</b>	0,773			
<b>3</b>	<b>0,021</b>	0,248		
<b>4</b>	<b>0,021</b>	0,083	0,149	
<b>5</b>	<b>0,007</b>	0,126	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>P</b>	Between Groups	69,430	4,000	17,357	24,195	<b>0,000</b>
	Within Groups	13,630	19,000	0,717		
	Total	83,060	23,000			
<b>K</b>	Between Groups	12028,359	4,000	3007,090	10,351	<b>0,000</b>
	Within Groups	5519,742	19,000	290,513		
	Total	17548,101	23,000			
<b>Ca</b>	Between Groups	1897,960	4,000	474,490	33,396	<b>0,000</b>
	Within Groups	269,950	19,000	14,208		
	Total	2167,910	23,000			
<b>Mg</b>	Between Groups	128,984	4,000	32,246	19,910	<b>0,000</b>
	Within Groups	30,772	19,000	1,620		
	Total	159,756	23,000			
<b>Fe</b>	Between Groups	14764046,197	4,000	3691011,549	4,099	<b>0,015</b>
	Within Groups	17109583,280	19,000	900504,383		
	Total	31873629,477	23,000			
<b>Zn</b>	Between Groups	19071,393	4,000	4767,848	3,870	<b>0,018</b>
	Within Groups	23406,930	19,000	1231,944		
	Total	42478,323	23,000			

Multiple Comparisons - Scheffe (P)					Multiple Comparisons - Scheffe (K)				
Variedade/linha	1	2	3	4	Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,728				2	0,984			
3	<b>0,032</b>	0,337			3	0,242	0,509		
4	<b>0,003</b>	<b>0,047</b>	0,822		4	0,384	0,693	0,998	
5	0,107	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	5	0,199	0,063	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>
Multiple Comparisons - Scheffe (Ca)					Multiple Comparisons - Scheffe (Mg)				
Variedade/linha	1	2	3	4	Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,846				2	0,415			
3	0,057	0,355			3	<b>0,043</b>	0,718		
4	<b>0,039</b>	0,270	1,000		4	0,095	0,904	0,995	
5	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	5	0,067	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Multiple Comparisons - Scheffe (Fe)					Multiple Comparisons - Scheffe (Zn)				
Variedade/linha	1	2	3	4	Variedade/linha	1	2	3	4
2	0,097				2	0,942			
3	0,214	0,992			3	1,000	0,927		
4	0,957	0,323	0,565		4	0,926	0,536	0,941	
5	0,997	0,086	0,216	0,991	5	0,245	0,724	0,222	<b>0,041</b>

**ANEXO VII - Informações relativas aos tratamentos estatísticos e outros dados relativos ao ensaio em vasos**

*Dados meteorológicos*

<b>Dia</b>	<b>Temperatura média (°C)</b>	<b>Insolação (h)</b>	<b>Dia</b>	<b>Temperatura média (°C)</b>	<b>Insolação (h)</b>
13-04-2011	22,00	11,10	04-05-2011	15,10	7,40
14-04-2011	20,50	11,20	05-05-2011	15,50	11,60
15-04-2011	18,50	10,90	06-05-2011	16,00	4,60
16-04-2011	19,50	11,60	07-05-2011	16,10	11,10
17-04-2011	14,80	10,30	08-05-2011	18,30	10,00
18-04-2011	18,30	6,80	09-05-2011	18,30	12,70
19-04-2011	17,30	6,10	10-05-2011	10,10	12,60
20-04-2011	15,30	6,50	11-05-2011	19,80	12,00
21-04-2011	15,40	6,60	12-05-2011	22,00	12,20
22-04-2011	13,90	6,50	13-05-2011	23,50	12,80
23-04-2011	16,60	4,40	14-05-2011	22,50	9,70
24-04-2011	19,50	7,90	15-05-2011	22,50	12,20
25-04-2011	19,90	12,00	16-05-2011	22,00	6,60
26-04-2011	19,70	12,30	17-05-2011	22,50	7,60
27-04-2011	19,90	8,80	18-05-2011	19,30	0,30
28-04-2011	18,60	11,00	19-05-2011	21,60	12,40
29-04-2011	19,50	2,60	20-05-2011	22,50	13,00
30-04-2011	18,60	1,10	21-05-2011	20,30	13,00
01-05-2011	17,00	5,30	22-05-2011	19,90	13,00
02-05-2011	17,30	5,20	23-05-2011	21,80	11,80
03-05-2011	15,90	12,10	24-05-2011	24,50	12,20

**Temperatura média observada durante o ensaio (°C)**

18,86

**Insolação média observada durante o ensaio (h)**

9,26

Análises de solos finais.

Modalidade	Vaso	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	MO(%)	Bases de troca (cmol(+)/kg)				Lakanen (mg kg <sup>-1</sup> )				N-NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
								Na	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn		
1	1	7,93	7,35	357,0	472,4	135,0	1,28	0,95	0,33	19,50	3,85	101,7	7,8	8,8	144,4	23,94	n.d.
	2	7,51	7,38	381,0	475,6	121,0	1,10	0,94	0,30	19,38	3,87	99,8	7,3	9,5	142,6	15,24	0,92
	3	8,08	7,51	233,0	488,0	142,0	1,26	0,88	0,45	18,85	3,69	105,1	7,5	9,4	141,6	9,35	0,86
	4	8,04	7,38	269,0	458,0	137,0	1,09	1,18	0,36	18,02	3,62	104,0	7,5	9,3	147,2	10,47	1,11
2	5	7,91	7,31	330,0	476,8	137,0	1,26	1,09	0,58	18,32	3,87	99,8	7,3	10,1	145,1	8,85	1,25
	6	8,14	7,52	292,0	472,0	135,0	2,00	1,13	0,35	19,79	3,86	99,5	8,1	9,8	147,5	5,05	1,28
	7	7,95	7,48	449,0	492,8	145,0	1,36	1,18	0,40	19,43	3,97	94,4	7,2	9,2	139,6	4,56	1,04
	8	7,98	7,45	433,0	520,0	141,0	1,41	1,17	0,35	19,96	4,00	109,1	7,7	9,5	151,1	4,61	1,09
3	17	7,92	7,25	461,0	487,2	197,0	1,86	0,87	0,30	18,72	3,81	101,7	8,0	9,4	147,4	2,85	1,11
	18	7,98	7,21	450,0	482,8	131,0	1,31	0,50	0,35	18,62	3,73	98,7	7,1	9,0	143,8	3,55	1,17
	19	7,98	7,24	489,0	469,2	130,0	1,45	0,82	0,29	19,43	3,84	104,3	7,6	9,4	156,5	4,98	1,46
	20	7,95	7,26	516,0	510,8	134,0	1,78	1,13	0,38	19,01	3,85	101,6	7,3	9,4	149,5	2,19	0,75
4	13	7,99	7,25	303,0	485,6	139,0	1,60	1,15	0,33	18,40	3,74	105,8	8,2	9,7	152,8	2,74	0,93
	14	7,88	7,19	425,0	530,8	148,0	1,55	0,81	0,29	18,91	3,85	101,2	7,4	9,6	149,1	3,36	0,91
	15	8,04	7,19	349,0	519,2	134,0	1,41	1,07	0,31	17,79	3,67	96,8	7,2	9,5	143,3	2,59	0,87
	16	8,06	7,28	345,0	518,4	139,0	1,41	0,84	0,32	19,09	3,73	97,5	7,4	10,0	146,8	2,78	1,35
5	21	8,08	7,37	293,0	467,2	124,0	1,26	0,81	0,28	18,24	3,51	101,9	7,9	9,1	148,4	2,69	1,03
	22	8,17	7,35	236,0	476,4	129,0	1,52	1,08	0,29	18,33	3,53	104,1	7,2	9,1	149,3	2,44	0,91
	23	7,98	7,39	391,0	463,2	127,0	1,67	1,27	0,55	19,72	3,92	103,0	7,5	8,9	150,1	3,59	1,15
	24	8,08	7,37	308,0	540,0	146,0	1,53	1,21	0,34	19,85	3,95	106,8	7,5	9,6	153,2	3,69	1,06
6	25	8,21	7,40	206,0	488,8	117,0	1,40	1,00	0,32	18,70	3,50	91,0	7,3	8,7	137,1	1,15	1,02
	26	8,04	7,32	302,0	480,8	130,0	1,43	1,03	0,31	19,62	3,72	89,1	7,0	9,3	136,5	1,32	0,93
	27	8,08	7,34	267,0	500,8	132,0	1,43	0,90	0,39	19,90	3,79	101,2	7,5	10,0	148,2	1,31	1,23
	28	7,95	7,38	408,0	493,2	125,0	1,33	1,03	0,29	19,07	3,66	93,3	7,0	8,8	139,8	1,71	1,17
7	29	8,05	7,43	318,0	455,6	125,0	1,41	0,85	0,30	18,99	3,68	93,2	7,7	9,6	141,8	1,61	0,76
	30	8,00	7,48	540,0	474,8	132,0	1,66	1,12	0,32	19,10	3,80	87,2	6,7	8,7	137,0	2,20	0,76
	31	7,78	7,46	302,0	465,6	115,0	1,55	1,07	0,32	19,57	3,75	93,2	7,2	9,5	138,6	1,76	0,95
	32	8,12	7,40	338,0	470,0	127,0	1,59	1,12	0,37	19,27	3,75	94,3	7,5	9,5	140,1	3,20	1,10

Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de nitratos acumulados na parte aérea das alfaces ( $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de matéria verde) do ensaio em vasos

**Teor de nitratos acumulados nas alfaces ( $\text{mg NO}_3^-/\text{Kg}$  matéria verde) – Resultados obtidos**

	Modalidade 1	Modalidade 2	Modalidade 3	Modalidade 4	Modalidade 5	Modalidade 6	Modalidade 7
R1	1045,16	248,85	498,90	294,41	584,42	106,61	466,66
R2	453,48	398,20	520,47	566,39	432,79	224,87	364,03
R3	857,44	452,57	145,57	361,67	180,11	124,69	354,80
R4	919,19	440,79	258,66	298,27	301,85	330,44	165,56
Média	818,82	385,10	355,90	380,19	374,79	196,65	337,76

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	893922,507	6	148987,085	5,765	0,001
Within Groups	542726,521	21	25844,120		
Total	1436649,029	27			

**Multiple Comparisons - Tukey HSD**

Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,015					
3	0,008	1,000				
4	0,013	1,000	1,000			
5	0,012	1,000	1,000	1,000		
6	0,000	0,649	0,795	0,675	0,703	
7	0,006	0,999	1,000	1,000	1,000	0,870

Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de azoto nítrico acumulado no solo ( $\text{mg N-NO}_3^-/\text{Kg}$  de terra fina) após a realização do ensaio em vasos

**Teor de azoto nítrico acumulado no solo ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de terra fina) – Resultados obtidos**

	Modalidade 1	Modalidade 2	Modalidade 3	Modalidade 4	Modalidade 5	Modalidade 6	Modalidade 7
R1	23,94	8,85	2,85	2,74	2,69	1,15	1,61
R2	15,24	5,05	3,55	3,36	2,44	1,32	2,20
R3	9,35	4,56	4,98	2,59	3,59	1,31	1,76
R4	10,47	4,61	2,19	2,78	3,69	1,71	3,20
Média	14,75	5,77	3,39	2,87	3,10	1,37	2,19



Kruskal Wallis Test			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Teor de nitratos no solo	22,507	6	0,001

Mann-Whitney Test						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,021					
3	0,021	0,083				
4	0,021	0,021	0,386			
5	0,021	0,021	1,000	0,773		
6	0,021	0,021	0,021	0,021	0,021	
7	0,021	0,021	0,149	0,149	0,083	0,043

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso seco (g) das alfaces do ensaio em vasos*

Peso seco (g) – Resultados obtidos							
	Modalidade 1	Modalidade 2	Modalidade 3	Modalidade 4	Modalidade 5	Modalidade 6	Modalidade 7
R1	21,38	25,09	26,58	25,83	21,48	22,70	25,15
R2	23,55	25,60	25,77	25,56	22,82	25,59	22,68
R3	22,84	25,83	24,92	25,56	23,26	24,04	23,10
R4	25,12	25,09	25,22	24,29	23,16	23,37	23,37
Média	23,223	25,403	25,623	25,310	22,680	23,925	23,575

ANOVA						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	33,670	6,000	5,612	5,648	0,001	
Within Groups	20,866	21,000	0,994			
Total	54,536	27,000				

Multiple Comparisons - Tukey HSD						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,069					
3	0,036	1,000				
4	0,090	1,000	0,999			
5	0,986	0,013	0,007	0,018		
6	0,949	0,390	0,244	0,463	0,583	
7	0,999	0,178	0,100	0,223	0,858	0,999

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao peso fresco (g) das alfaces do ensaio em vasos*

<b>Peso fresco (g) – Resultados obtidos</b>							
	<b>Modalidade 1</b>	<b>Modalidade 2</b>	<b>Modalidade 3</b>	<b>Modalidade 4</b>	<b>Modalidade 5</b>	<b>Modalidade 6</b>	<b>Modalidade 7</b>
R1	351,0	392,6	415,4	402,8	365,8	373,9	392,7
R2	397,2	386,6	404,2	395,8	393,3	364,7	395,1
R3	378,3	394,2	383,7	385,6	385,2	351,6	393,8
R4	404,8	402,8	402,4	400,3	371,0	360,3	397,7
Média	382,8	394,1	401,4	396,1	378,8	362,6	394,8

<b>ANOVA</b>						
	<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>	
Between Groups	4321,074	6	720,179	4,581	0,004	
Within Groups	3301,375	21	157,208			
Total	7622,449	27				

<b>Multiple Comparisons - Tukey HSD</b>						
<b>Modalidade</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	0,859					
<b>3</b>	0,389	0,979				
<b>4</b>	0,742	1,000	0,996			
<b>5</b>	0,999	0,613	0,192	0,471		
<b>6</b>	0,299	<b>0,027</b>	<b>0,004</b>	<b>0,016</b>	0,546	
<b>7</b>	0,819	1,000	0,988	1,000	0,559	<b>0,022</b>

*Resultados e tratamento estatístico relativo ao teor de nutrientes nos tecidos da parte aérea das alfaces do ensaio em vasos*

Mod.	Vaso	Macronutrientes (g kg <sup>-1</sup> )					Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
1	1	30,44	2,30	39,36	16,46	6,48	272,0	11,5	56,6	51,0
	2	27,87	1,90	41,83	15,72	6,20	358,5	9,5	50,9	60,7
	3	30,84	1,85	37,12	14,98	6,36	379,5	7,0	52,6	61,5
	4	28,94	1,84	36,82	17,14	6,66	462,8	7,7	45,2	70,4
2	5	26,81	1,73	33,96	15,52	5,64	408,0	6,4	44,1	61,9
	6	26,39	1,53	35,18	15,58	5,98	497,8	4,7	41,8	66,5
	7	26,07	1,56	33,78	16,23	5,92	430,7	4,2	43,1	66,0
	8	28,74	1,73	34,52	15,40	5,77	359,6	5,7	43,1	64,8
3	17	28,92	1,70	35,63	16,59	6,87	437,8	1,6	49,3	70,6
	18	28,65	1,81	35,93	16,08	6,19	268,4	4,7	47,4	62,3
	19	26,17	1,61	32,47	16,49	6,42	365,7	4,9	46,0	61,4
	20	29,88	1,80	35,86	16,12	5,77	369,7	4,6	41,5	60,6
4	13	26,36	1,67	36,10	16,46	6,39	972,0	4,5	42,7	88,6
	14	27,53	1,60	37,32	15,21	5,72	383,6	4,8	50,3	73,8
	15	27,10	1,62	36,63	15,96	6,15	510,8	3,9	44,4	62,8
	16	28,71	1,69	36,68	15,78	6,33	411,9	4,2	45,7	74,6
5	21	28,13	1,89	40,58	16,22	6,62	266,3	11,5	60,7	65,4
	22	30,91	1,83	40,62	17,75	6,68	396,8	9,4	60,5	70,3
	23	28,99	1,76	38,24	17,30	6,51	420,3	6,8	49,9	61,5
	24	28,56	1,75	36,49	16,36	6,33	423,6	5,7	50,7	73,4
6	25	24,35	1,81	37,12	15,58	5,91	334,2	4,4	44,6	64,9
	26	21,43	1,52	33,02	15,81	5,63	345,4	5,8	45,5	65,3
	27	23,31	1,61	35,91	16,98	6,10	803,0	4,5	46,8	78,8
	28	24,46	1,92	35,48	12,66	5,30	605,5	6,2	49,6	69,5
7	29	25,92	1,90	36,21	17,53	6,29	376,0	5,0	55,6	63,8
	30	27,38	1,76	38,41	17,89	6,40	449,9	5,4	60,7	70,2
	31	29,83	1,86	39,57	18,51	7,00	556,5	6,2	51,2	77,1
	32	27,59	1,83	39,87	16,80	6,54	581,3	4,0	49,2	74,8

Kruskal Wallis Test			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
<b>P</b>	15,359	6	<b>0,018</b>
<b>K</b>	19,519	6	<b>0,003</b>

Mann-Whitney Test (P)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	<b>0,019</b>					
3	<b>0,037</b>	0,178				
4	<b>0,019</b>	0,752	0,222			
5	0,129	<b>0,037</b>	0,278	<b>0,036</b>		
6	0,102	0,557	0,882	0,766	0,457	
7	0,343	<b>0,019</b>	0,063	<b>0,018</b>	0,343	0,225

Mann-Whitney Test (K)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	<b>0,021</b>					
3	<b>0,020</b>	0,245				
4	0,083	<b>0,021</b>	<b>0,020</b>			
5	1,000	<b>0,020</b>	<b>0,019</b>	0,146		
6	0,059	0,248	0,767	0,149	<b>0,042</b>	
7	1,000	<b>0,021</b>	<b>0,020</b>	0,149	0,561	<b>0,043</b>

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Nkj</b>	Between Groups	0,993	6	0,166	9,161	<b>0,000</b>
	Within Groups	0,380	21	0,018		
	Total	1,373	27			
<b>Ca</b>	Between Groups	0,158	6	0,026	3,208	<b>0,021</b>
	Within Groups	0,172	21	0,008		
	Total	0,330	27			
<b>Mg</b>	Between Groups	0,027	6	0,004	5,003	<b>0,003</b>
	Within Groups	0,019	21	0,001		
	Total	0,046	27			

Multiple Comparisons - Tukey HSD (Nkj)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,167					
3	0,902	0,757				
4	0,345	0,999	0,942			
5	1,000	0,307	0,984	0,553		
6	<b>0,000</b>	<b>0,015</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	
7	0,490	0,990	0,986	1,000	0,712	<b>0,003</b>

Multiple Comparisons - Tukey HSD (Ca)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,995					
3	1,000	0,945				
4	1,000	1,000	0,991			
5	0,832	0,471	0,962	0,660		
6	0,866	0,995	0,660	0,962	0,183	
7	0,209	0,065	0,383	0,120	0,897	<b>0,017</b>

Multiple Comparisons - Tukey HSD (Mg)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,091					
3	0,996	0,262				
4	0,786	0,721	0,979			
5	1,000	<b>0,044</b>	0,960	0,579		
6	<b>0,035</b>	0,999	0,114	0,438	<b>0,016</b>	
7	0,999	<b>0,035</b>	0,932	0,507	1,000	<b>0,012</b>

Kruskal Wallis Test			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
<b>Fe</b>	6,192	6	0,402
<b>Cu</b>	17,175	6	<b>0,009</b>

Mann-Whitney Test (Cu)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
<b>2</b>	<b>0,021</b>					
<b>3</b>	<b>0,021</b>	0,309				
<b>4</b>	<b>0,021</b>	0,191	0,564			
<b>5</b>	0,468	0,059	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>		
<b>6</b>	<b>0,021</b>	1,000	0,564	0,191	0,083	
<b>7</b>	<b>0,021</b>	0,773	0,149	0,149	<b>0,043</b>	0,885

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Zn</b>	Between Groups	536,744	6	89,457	5,631	<b>0,001</b>
	Within Groups	333,617	21	15,887		
	Total	870,361	27			
<b>Mn</b>	Between Groups	563,544	6	93,924	2,161	0,089
	Within Groups	912,682	21	43,461		
	Total	1476,227	27			

Multiple Comparisons - Tukey HSD (Zn)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
<b>2</b>	0,093					
<b>3</b>	0,519	0,929				
<b>4</b>	0,461	0,954	1,000			
<b>5</b>	0,762	<b>0,004</b>	<b>0,042</b>	<b>0,034</b>		
<b>6</b>	0,643	0,855	1,000	1,000	0,064	
<b>7</b>	0,946	<b>0,011</b>	0,104	0,086	0,999	0,153

*Resultados e tratamento estatístico relativo exportações da parte aérea das alfaces do ensaio em vasos*

Mod.	Vaso	Macronutrientes (mg vaso <sup>-1</sup> )					Micronutrientes (mg vaso <sup>-1</sup> )			
		Nkj	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
1	1	650,78	49,25	841,30	351,83	138,56	5,82	0,24	1,21	1,09
	2	656,34	44,86	985,11	370,09	145,88	8,44	0,22	1,20	1,43
	3	704,43	42,36	847,80	342,22	145,15	8,67	0,16	1,20	1,40
	4	726,87	46,35	924,80	430,52	167,33	11,62	0,19	1,13	1,77
(2	5	672,64	43,46	851,97	389,30	141,37	10,23	0,16	1,11	1,55
	6	675,45	39,26	900,44	398,81	153,15	12,74	0,12	1,07	1,70
	7	673,54	40,33	872,59	419,39	152,98	11,13	0,11	1,11	1,70
	8	721,26	43,47	866,29	386,53	144,75	9,02	0,14	1,08	1,63
3	17	768,52	45,26	946,87	440,83	182,56	11,64	0,04	1,31	1,88
	18	738,28	46,82	926,00	414,32	159,64	6,92	0,12	1,22	1,61
	19	652,22	40,21	809,07	411,00	160,01	9,11	0,12	1,15	1,53
	20	753,76	45,44	904,45	406,69	145,49	9,33	0,12	1,05	1,53
4	13	680,76	43,10	932,41	425,13	165,06	25,10	0,12	1,10	2,29
	14	703,69	40,93	953,91	388,62	146,29	9,80	0,12	1,29	1,89
	15	692,76	41,53	936,25	407,96	157,28	13,06	0,10	1,13	1,61
	16	697,47	41,09	890,92	383,33	153,88	10,00	0,10	1,11	1,81
5	21	604,20	40,70	871,73	348,45	142,15	5,72	0,25	1,30	1,40
	22	705,33	41,79	926,88	405,08	152,32	9,05	0,21	1,38	1,60
	23	674,37	41,08	889,67	402,44	151,35	9,78	0,16	1,16	1,43
	24	661,59	40,51	845,24	379,05	146,63	9,81	0,13	1,18	1,70
6	25	552,72	41,16	842,58	353,60	134,18	7,59	0,10	1,01	1,47
	26	548,38	38,91	845,09	404,72	143,98	8,84	0,15	1,16	1,67
	27	560,45	38,81	863,31	408,34	146,72	19,31	0,11	1,12	1,89
	28	571,43	44,86	829,00	295,73	123,88	14,15	0,14	1,16	1,62
7	29	652,01	47,73	910,56	440,76	158,30	9,46	0,13	1,40	1,60
	30	620,98	39,85	871,01	405,78	145,21	10,20	0,12	1,38	1,59
	31	689,07	42,91	913,97	427,67	161,80	12,85	0,14	1,18	1,78
	32	644,78	42,76	931,85	392,76	152,82	13,59	0,09	1,15	1,75

Kruskal Wallis Test			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
<b>N</b>	15,635	6,000	<b>0,016</b>
<b>Fe</b>	8,305	6,000	0,217
<b>Cu</b>	16,272	6,000	<b>0,012</b>
<b>Zn</b>	12,402	6,000	0,054

Mann-Whitney Test (N)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	0,773					
3	0,149	0,248				
4	1,000	0,248	0,248			
5	0,773	0,386	0,149	0,248		
6	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>	
7	0,149	0,149	<b>0,043</b>	<b>0,043</b>	0,564	<b>0,021</b>

Mann-Whitney Test (Cu)						
Modalidade	1	2	3	4	5	6
2	<b>0,029</b>					
3	<b>0,018</b>	0,282				
4	<b>0,019</b>	0,137	0,739			
5	0,663	0,110	<b>0,018</b>	<b>0,019</b>		
6	<b>0,021</b>	0,559	0,554	0,372	0,083	
7	<b>0,021</b>	0,559	0,282	0,372	0,059	0,663

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>P</b>	Between Groups	82,239	6,000	13,707	2,319	0,071
	Within Groups	124,107	21,000	5,910		
	Total	206,346	27,000			
<b>K</b>	Between Groups	17032,688	6,000	2838,781	1,722	0,165
	Within Groups	34610,365	21,000	1648,113		
	Total	51643,053	27,000			
<b>Ca</b>	Between Groups	10006,140	6,000	1667,690	1,840	0,140
	Within Groups	19029,599	21,000	906,171		
	Total	29035,739	27,000			
<b>Mg</b>	Between Groups	1453,178	6,000	242,196	2,533	0,053
	Within Groups	2007,828	21,000	95,611		
	Total	3461,006	27,000			
<b>Mn</b>	Between Groups	0,514	6,000	0,086	2,385	0,065
	Within Groups	0,755	21,000	0,036		
	Total	1,269	27,000			

*Resultados do doseamento de proteínas*

<b>Proteínas (mg de proteína ml<sup>-1</sup> de extracto) – Resultados obtidos</b>							
	<b>Modalidade 1</b>	<b>Modalidade 2</b>	<b>Modalidade 3</b>	<b>Modalidade 4</b>	<b>Modalidade 5</b>	<b>Modalidade 6</b>	<b>Modalidade 7</b>
R11	0,235	0,687	0,624	0,628	0,617	0,571	0,724
R21	0,472	0,484	0,440	0,827	0,663	0,611	0,824
R31	0,716	0,814	0,923	0,539	0,527	0,862	0,682
R41	0,550	0,442	0,719	0,354	0,404	0,556	0,712
R12	0,219	0,636	0,557	0,607	0,603	0,583	0,761
R22	0,478	0,489	0,501	0,777	0,617	0,614	0,867
R32	0,696	0,810	1,073	0,571	0,552	0,615	0,682
R42	0,548	0,444	0,684	0,372	0,392	0,560	0,658
R13	0,220	0,648	0,551	0,674	0,631	0,573	0,718
R23	0,488	0,486	0,442	0,796	0,644	0,631	0,840
R33	0,708	0,843	0,930	0,590	0,524	0,835	0,692
R43	0,544	0,464	0,671	0,369	0,407	0,566	0,701
Média	0,490	0,604	0,676	0,592	0,548	0,631	0,738

*Resultados e tratamento estatístico relativo à avaliação da actividade da enzima nitrato-redutase.*

<b>Avaliação da actividade da enzima nitrato-redutase (mg NO<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> de Proteína h<sup>-1</sup>) Resultados obtidos</b>							
	<b>Modalidade 1</b>	<b>Modalidade 2</b>	<b>Modalidade 3</b>	<b>Modalidade 4</b>	<b>Modalidade 5</b>	<b>Modalidade 6</b>	<b>Modalidade 7</b>
R11	1,056	0,355	0,405	0,373	0,418	0,437	0,277
R21	0,559	0,606	0,569	0,251	0,326	0,405	0,242
R31	0,341	0,307	0,257	0,505	0,492	0,299	0,303
R41	0,544	0,560	0,317	0,816	0,624	0,415	0,339
R12	1,158	0,402	0,455	0,397	0,423	0,435	0,284
R22	0,520	0,609	0,468	0,310	0,387	0,382	0,259
R32	0,375	0,313	0,231	0,481	0,487	0,404	0,333
R42	0,601	0,620	0,372	0,784	0,734	0,421	0,382
R13	1,228	0,429	0,482	0,336	0,423	0,422	0,336
R23	0,605	0,581	0,605	0,257	0,419	0,401	0,307
R33	0,400	0,276	0,253	0,467	0,537	0,289	0,327
R43	0,566	0,598	0,341	0,753	0,672	0,436	0,388
Média	0,663	0,471	0,396	0,478	0,495	0,396	0,315